

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/006820

International filing date: 31 March 2005 (31.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-136756
Filing date: 30 April 2004 (30.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 09 June 2005 (09.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2004年 4月30日

出願番号
Application Number: 特願2004-136756

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

J P 2004-136756

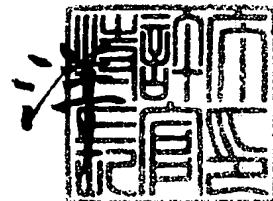
The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

出願人
Applicant(s): ジェノミディア株式会社
アンジェスMG株式会社

2005年 5月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 P2004-002
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 31/00
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府吹田市五月が丘西 6-3-406
【氏名】 山本 誠司
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府大阪市東淀川区上新庄 2-11-26-601
【氏名】 平岡 和也
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府豊中市上野西 4-8-30-501
【氏名】 小谷 均
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東 6-12-8
【氏名】 金田 安史
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府豊中市南桜塚 4-13-8-407
【氏名】 河野 博和
【発明者】
【住所又は居所】 大阪府池田市旭丘 1-6-10-103
【氏名】 福村 正之
【特許出願人】
【識別番号】 302060281
【氏名又は名称】 ジェノミディア株式会社
【代表者】 小谷 均
【特許出願人】
【識別番号】 500409323
【氏名又は名称】 アンジェス エムジー株式会社
【代表者】 山田 英
【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2004-108599
【出願日】 平成16年 3月31日
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 194136
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

ウイルスエンベロープからなる免疫アジュバント。

【請求項 2】

前記アジュバントが免疫応答を増強させるアジュバントである、請求項 1 記載のアジュバント。

【請求項 3】

前記アジュバントが抗腫瘍免疫を増強させるアジュバントである、請求項 1 または 2 記載のアジュバント。

【請求項 4】

前記ウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルベスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスである、請求項 1 ないし 3 記載のアジュバント。

【請求項 5】

前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルベスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた 1 種である、請求項 1 ないし 4 記載のアジュバント。

【請求項 6】

前記ウイルスがセンダイウイルスである、請求項 1 ないし 5 記載のアジュバント。

【請求項 7】

センダイウイルスエンベロープの免疫アジュバントとしての使用。

【請求項 8】

センダイウイルスエンベロープの抗腫瘍免疫アジュバントとしての使用。

【請求項 9】

抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として CTL 細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープとシスプラチニンの使用。

【請求項 10】

抗原提示細胞の腫瘍抗原提示能を高め、その結果として CTL 細胞の腫瘍組織へ集積させるための、ウイルスエンベロープ、シスプラチニンおよび化学療法剤の使用。

【請求項 11】

前記ウイルスエンベロープがセンダイウイルスエンベロープである、請求項 9 または 10 記載の使用。

【請求項 12】

前記化学療法剤がブレオマイシンである、請求項 9 ないし 11 記載の使用。

【請求項 13】

免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。

【請求項 14】

化学療法剤が制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤である、請求項 13 記載の医薬組成物。

【請求項 15】

化学療法剤がブレオマイシン類、アントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、カンプトテシン類、シスプラチニン類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル (5-FU) およびその誘導体、ビラルビシンおよびそれらの薬理学的に許容される塩から選ばれた 1 種以上である、請求項 13 または 14 記載の医薬組成物。

【請求項 16】

ブレオマイシン類が、ブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペブロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項 15 ないし 16 記載の医薬組成物。

【請求項 17】

ブレオマイシン類が、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ベブロマイシンである、請求項 13 ないし 16 記載の医薬組成物。

【請求項 18】

免疫惹起能を有するウイルスが、レトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、フラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルベスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘバドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルス由来である、請求項 13 ないし 17 記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記ウイルスがセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルベスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルスまたはインフルエンザウイルスから選ばれた 1 種である、請求項 13 ないし 18 記載の医薬組成物。

【請求項 20】

化学療法剤が塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシンまたは硫酸ベブロマイシンから選ばれた 1 種以上であり、ウイルスがセンダイウイルスである、請求項 13 ないし 20 記載の医薬組成物。

【請求項 21】

注射剤である請求項 13 ないし 20 記載の医薬組成物。

【請求項 22】

化学療法剤をウイルスエンベロープベクターに封入する工程において界面活性剤を使用することを特徴とする、請求項 13 ないし 21 記載の医薬組成物。

【請求項 23】

界面活性剤がトリトン (Triton) X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩から選ばれた 1 種である、請求項 22 記載の医薬組成物。

【請求項 24】

固体癌の治療剤である、請求項 13 ないし 23 記載の医薬組成物。

【請求項 25】

固体癌が、肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫または原発不明癌から選ばれた 1 種である、請求項 13 ないし 24 記載の医薬組成物。

【請求項 26】

消化器癌が胃癌、大腸癌または食道癌から選ばれた 1 種である、請求項 25 記載の医薬組成物。

【請求項 27】

頭頸部癌が上頸癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌または口腔癌から選ばれた 1 種である、請求項 25 記載の医薬組成物。

【請求項 28】

婦人科領域の癌が子宮癌、卵巣癌または子宮頸癌から選ばれた 1 種である、請求項 25 記載の医薬組成物。

【請求項 29】

泌尿器科領域の癌が前立腺癌である、請求項 25 記載の医薬組成物。

【請求項 30】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-E に封入した抗ガン剤または免疫促進剤を含有する薬学的組成物。

【請求項 31】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-E に封入した抗ガン剤または免疫促進剤とさらなる抗ガン剤を含有する薬学的組成物。

【請求項 32】

HVJ-E がリボソームでないことを特徴とする請求項 30 または 31 記載の薬学的組成物。

【請求項 3 3】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-Eに封入した抗ガン剤または免疫促進剤を含有する薬学的組成物の使用。

【請求項 3 4】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、HVJ-Eに封入した抗ガン剤または免疫促進剤とさらなる抗ガン剤を含有する薬学的組成物の使用。

【請求項 3 5】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置する薬剤組成物を製造するための、アジュバントとしてのHVJ-Eの使用。

【請求項 3 6】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導し固体腫瘍を処置するための、アジュバントおよび抗ガン剤または免疫促進剤封入ベクターとしての、HVJ-Eの使用。

【請求項 3 7】

生体内において腫瘍免疫を惹起させるための、HVJ-Eと抗ガン剤の併用。

【請求項 3 8】

固体腫瘍組織内に細胞傷害性Tリンパ球(CTL)を導入し抗腫瘍効果を惹起するための、HVJ-Eの使用。

【請求項 3 9】

生体内において抗腫瘍免疫を誘導する術前補助療法(ネオアジュバント療法)としてのHVJ-Eの使用。

【請求項 4 0】

HVJ-Eがリボソームでないことを特徴とする請求項3 3ないし3 9記載の使用法。

【請求項 4 1】

抗ガン剤がブレオマイシンまたはその薬理学的に許容される塩、あるいはペブロマイシンまたはその薬理学的に許容される塩である、請求項3 0ないし3 9記載の薬学的組成物またはその使用。

【請求項 4 2】

免疫促進剤が顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)を含むタンパク質である、請求項3 0ないし3 9記載の薬学的組成物またはその使用。

【書類名】明細書

【発明の名称】化学療法剤を封入した医薬組成物

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子導入ベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤、好ましくは制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤(以下まとめて、抗癌剤という)を移入する際に用いる医薬組成物に関する。より詳しくは、本発明は毒性の高い抗癌剤を遺伝子導入ベクターを用いて生体移入し、副作用を軽減して安全に、標的臓器あるいは細胞に到達させる医薬組成物に関する。

【0002】

さらに本発明は、生体内で抗腫瘍免疫を惹起するためのビヒクルに関する。特に、本発明は、ウイルス、不活性化ウイルス、特に不活性化HVJ(センダイウイルス)により、抗原提示細胞と腫瘍細胞を融合し抗腫瘍免疫を惹起させ、さらにCpG-ODNの添加により抗腫瘍免疫を高めることに関する。あるいは、ウイルス、不活性化ウイルス、特に不活性化HVJ(センダイウイルス)に融合化学療法剤、好ましくは抗がん剤、あるいは能動免疫を誘導する遺伝子あるいは剤を封入し封入物を固形腫瘍に導入し、抗癌剤の全身投与との併用により高い抗腫瘍免疫を惹起させるに関する。

【背景技術】

【0003】

現在のがん治療における治癒率は約50%程度といわれ、その治癒は一般的には外科療法や放射線療法など局所療法によりもたらされる場合が多い。特に固形癌の治療においては、全身療法である化学療法が単独で治癒に貢献する割合は極めて少なく、各種療法と併用されるのが通常である。

【0004】

一方外科療法では、全ての臓器癌の手術が可能となり、治療法として既に完成域に達していると考えられ、これ以上の治癒率向上は望めない。また放射線療法も感受性のある臓器癌の治療成績がほぼ一定率に達しており、同様にこれ以上の治癒率向上は望めない。

【0005】

従ってこれらの治療法により、今後の癌治癒率の大幅な向上は期待しがたいため、癌の治癒率を現状の50%からさらに改善し癌制圧に達するには、より優れた化学療法の開発が欠かせない。

【0006】

化学療法に使用される抗癌剤は、癌細胞のような増殖能の高い細胞の殺細胞効果を目的としており、正常細胞、特に細胞増殖能の高い骨髄細胞等に与えるダメージが大きく、その結果患者に与える苦痛も大である。これは抗癌剤の送達法が注射剤による全身への投与であり、がん細胞以外の正常細胞にも抗癌剤が到達し、正常細胞が殺傷されホメオスタシスが機能しなくなるためである。

【0007】

しかし現状では、抗癌剤を単独投与した際の効果は概ね30%程度であるとされており、ゲノムの遺伝子情報解析研究が進められ適切な抗癌剤の選定が今後可能なることも期待されているが、現時点での抗癌剤療法は効果と比較して副作用が高いといわれている。

【0008】

これは抗癌剤全身投与により正常細胞がダメージを受けたためである。よって、癌組織特異的な抗癌剤の導入、加えて癌細胞への取り込み方法が確立できれば、理想的な抗癌剤の送達システムとなる。さらに、抗癌剤のベシクル(vesicle)への封入が可能になれば、標的臓器・細胞選択的に、しかも正常細胞への影響(副作用)が少ない治療法を確立できる。また、これにより副作用が強く開発を断念した抗癌剤の再評価に結びつくものと考えられる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明者らは上記問題を解決すべく銳意検討した結果、化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する医薬組成物を完成させることができた。

加えて、*ex vivo*でウイルスエンベロープベクターにより抗原提示細胞と腫瘍細胞を効率よく融合させ、アジュバンドの一つとして考えられるCpG-ODNと併用による抗腫瘍効果を導くことができた。

さらに臨床応用により近い方法として、抗癌剤をウイルスエンベロープベクターに封入し直接腫瘍に導入し、他の抗がん剤の全身投与との併用により、非常腫瘍特異的な非常に高い抗腫瘍免疫を惹起でき、腫瘍の退縮を誘導できた。

【0010】

従って本発明は具体的には例えば、外来遺伝子の封入能を有する不活性化HVJ-Eベクター等の中に、抗癌剤等を封入した医薬組成物を提供するものである。

加えて本発明は*ex vivo*で抗原提示細胞と腫瘍細胞をHVJ-Eベクター等による融合させ、*in vivo*で、CpG-ODNとの併用により抗腫瘍効果作用を提供するものである。

さらに、腫瘍に抗癌剤を含有したHVJ-Eベクター等と導入し、全身への抗癌剤投与との併用により高い抗腫瘍免疫を惹起し、腫瘍退縮させる方法を提供するものである。

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

【発明の効果】

【0012】

本発明により副作用が大きな抗癌剤を、簡便しかも安全に癌部に送達できる方法が提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明において使用される化学療法剤とは、細胞に直接作用する低分子化合物であれば限定されないが、例えば東京化学同人刊・生化学事典第3版には、「現在、選択毒性の高い化学物質を用いる治療法すなわち化学療法の対象は微生物による感染症のみならず悪性腫瘍にまで広げられている。」と記載されており、抗菌剤、抗癌剤等が含まれることは論を待たない。

【0014】

なお本発明においては、化学療法剤としてより好ましくは制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤(以下、抗癌剤と総称)を挙げることができ、抗癌剤としてさらに具体的には例えば、ブレオマイシン類、アドリアマイシン・ダウノマイシンのアントラキノン系制癌剤、マイトマイシン類、アクチノマイシン類、イリノテカン等のカンプトテシン類、シスプラチニン類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ビラルビシンおよびそれらの薬理学的に許容される塩を挙げることができる。

【0015】

これら化学療法剤の中でも、さらに好ましくはブレオマイシン類を挙げることができ、具体的にはブレオマイシン(Bleomycin)またはその薬理学的に許容される塩、あるいはペプロマイシン(Peplomycin)またはその薬理学的に許容される塩を挙げることができ、さらに詳しくは塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシンを挙げることができる。

【0016】

本発明にかかる医薬組成物を抗癌剤として使用する場合、適応となる癌の種類は限定されず、具体的には固形癌、血液細胞癌等を挙げることができる。これらの中でも固形癌が好適対象である。

【0017】

固形癌としてより具体的には、例えば肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等を挙げることができ、さらに具体的には、例えば消化器癌として胃癌、大腸癌、食道癌等を、頭頸部癌として

上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌等を、婦人科領域の癌として子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌等を、泌尿器科領域の癌として前立腺癌等を挙げることができる。

【0018】

これらの固形癌の中でも、より好適な対象としては、皮膚癌、皮膚悪性腫瘍、頭頸部癌(上顎癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、口腔癌など)、肺癌(特に原発性および転移性扁平上皮癌)、食道癌、悪性リンパ腫(細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病など)、子宮頸癌、神経膠腫、甲状腺癌、前立腺癌を挙げることができる。

【0019】

次に本発明におけるウイルスエンベローブベクターとは、ウイルスからRNAまたはDNAを取り除いた膜であり、通常は遺伝子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プラスミド等を封入して細胞移入(transfection)に利用されるものである。

【0020】

ウイルスの種類も限定されないが具体的には、例えばレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、ラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルベスウイルス科、パキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスを挙げることができる。

本発明にかかるウイルスとしてさらに具体的には、例えばセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルベスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス、インフルエンザウイルス等を挙げることができる。

【0021】

これらの中でも、好ましくはマウス肺炎ウイルスの一つであるセンダイウイルス(Hemagglutinating Virus of Japan、以下 HVJ)を挙げることができる。

【0022】

なおセンダイウイルスとして具体的には、例えばVR-105、VR-907等をAmerican Type Culture Collection (ATCC。住所: P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, TEL [1]-703-365-2700) から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376,VR-105&text=Sendai&max=20>

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Sendai&max=20>

【0023】

ウイルスエンベローブベクターについてより詳しくは、例えば特開2001-286282号公報(W001/57204号公報)、特開2002-065278号公報、W003/014338号公報等に記載されており、具体的には例えば特開2001-286282号公報の実施例8などに従って調製することができる。

【0024】

なお化学療法剤をウイルスエンベローブベクターに封入する工程においては界面活性剤を使用することが好ましく、界面活性剤として具体的には、例えばトリトン(Triton)X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩等を挙げることができる。デオキシコール酸の塩として好ましくはデオキシコール酸ナトリウム、コール酸の塩として好ましくはコール酸ナトリウムを挙げることができる。

【0025】

本発明にかかる医薬組成物の剤型は限定されないが、具体的には例えば注射剤、軟膏等を挙げることができ、好ましくは注射剤である。

【0026】

続いて不活性化センダイウイルス・エンベローブベクター(以下、HVJ-Eベクター)の場合を例にとって、より詳細に説明する。

【0027】

HVJ-Eベクターに抗癌剤を封入する場合には、抗癌剤を緩衝液に溶解する。ここで使用する緩衝液は限定されず、具体的には例えば、TE緩衝液(10mMトリス、1mM EDTA (pH8.0))

、PBS(リン酸緩衝液)等を適宜選択し使用できるか、pHが6-9の緩衝液が好ましい。

【0028】

本発明の特長として、副作用あるいは毒性の強い抗癌剤をHVJ-Eベクターに封入し、*in vitro*実験では培養液中に抗癌剤がもれることなく直接細胞に抗癌剤を送達することができる。

【0029】

また*in vivo*動物実験においては、抗癌剤の全身投与ではなく、局所投与を行うことが可能であり、固体癌の癌細胞のみに効率よく抗癌剤を送達することができる。

【0030】

さらに入人の治療においては、抗癌剤封入HVJ-Eベクターの単独投与による化学療法だけではなく、進行癌患者で抗癌剤の投与不能な患者に対し局所投与を行うことにより癌の退縮を図り、さらに放射線治療、外科的処理との併用により、一層優れた抗癌効果が得られる。

【0031】

抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターは、*in vitro*実験ではホスト細胞にトランスフェクションする。その場合の手続きは、例えば抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターの溶液を培養細胞の培地に添加するなどの方法を採用することができる。

【0032】

トランスフェクションは37°Cで反応させる場合、30分以上、48時間程度とする。効果判定は生細胞数のカウントあるいはWST assay(生細胞のカウント手法: cell counting kit-8、同仁化学)により行うのが好ましい。

【0033】

*in vivo*動物実験における対象は、例えばマウスの場合、癌細胞が同系移植では免疫不全マウスではない通常マウスを、異種移植の場合はヌードマウスあるいはSCIDマウスを使用するのが好ましい。

【0034】

ペトリディッシュで培養した培養癌細胞をマウスの皮内に移植し、移植細胞が増殖後、抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターを増殖固体癌部内に投与し、癌部の長径および短径を測定し、その抗癌効果測定をするなどの方法を採用することができる。

【0035】

続いて、さらに本発明を詳述する。

近年、悪性腫瘍に対する治療成績は化学療法を中心とする集学的治療の進歩によって著しく向上している。特に白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍においては、造血幹細胞移植などとの併用により治癒も十分に期待できるものとなっている。しかし、抗がん剤や放射線治療などによる毒性効果のみしか認められない場合があり、腫瘍細胞撲滅には限界がある。免疫機構による選択的腫瘍細胞排除が重要であることが基礎的研究ならびに臨床的観察より明らかになってきている。免疫機構は粘膜、非粘膜器官を問わずタンパク質(ペプチド)および糖質、脂質等の非ペプチド抗原を認識して作用する。病原体進入の際、主に単球が進入局所に遊走し、貪食作用などを介して抗原に非特異的な防御応答を行う。糖質や脂質などの非ペプチド等に対する自然免疫がまず惹起され、病原体排除に関する種々の因子の産生を帮助する。その後病原体ペプチドを認識するリンパ球が増殖、分化し、Bリンパ球は抗体産生細胞に分化し、Tリンパ球が免疫系をコントロールするヘルパーT細胞や細胞性障害T細胞などに分化し抗原特異的免疫応答、いわゆる獲得免疫を誘導する。獲得免疫には抗体が主体をなす体液性免疫とTリンパ球が主体となる細胞性免疫がある。免疫が細胞性免疫あるいは体液性免疫のどちらが主導になるかは、ヘルパーT細胞の2つの亜集団である、Th1あるいはTh2のどちらが優位になるかによって決定される。免疫状態がTh1に傾けば細胞性免疫が優位になり、一方Th2に傾けば体液性免疫が優位になる。両者はお互いの免疫バランスの上に成り立っており、これら免疫状態は種々の細胞が分泌する液性分子であるサイトカインに依存している。Th1型サイトカインとしてIL-12、IFN γ などが、一方Th2型サイトカインとして、IL-4、IL-5などが挙げられる。

【0036】

免疫、特に腫瘍免疫を考える場合には、CD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)およびCD4陽性ヘルパーT細胞が非常に重要な役割を果たしていることが報告(North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991, Pardoll DM. 1998)されている。特に免疫された動物のCD8陽性T細胞(CTL)は、*in vitro*で直接標的細胞を障害し(Wanger H. 1980)。養子免疫による非免疫動物に腫瘍抵抗性を持たせることができた(North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991)との報告がなされている。したがって、腫瘍特異的CTLをいかに効率よく誘導できるかが抗腫瘍療法の開発において重要である。CTLによる抗腫瘍免疫はT細胞レセプターを介して、腫瘍細胞表面に発現された主要組織抗原(major histocompatibility complex: MHC)クラスI分子と腫瘍抗原由来ペプチドの複合体をCTLが認識し、パフォーリン等を腫瘍細胞に導入することによって細胞障害性を発揮する。腫瘍特異的CTL誘導には、まず腫瘍細胞特異的に発現され、細胞内でプロセスされてペプチド断片としてMHCに提示されうる標的抗原ペプチドを同定することに主眼が置かれ、Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Library (SEREX)法により高力値のIgG抗体を産生する多くのペプチド分子が見出されている。

【0037】

しかし、腫瘍ペプチドの同定のみで腫瘍免疫を語ることは困難である。同定されたペプチドを*in vivo*で細胞表面上に如何に効率よく提示させるかという点、co-stimulatory moleculeであるCD80/CD86の発現など、残されている課題は多い。詳述すれば、効率的に当該ペプチドを発現させてもco-stimulatory moleculeであるCD80/CD86などの発現が低く、抗原シグナルのみが伝わった場合は抗原特異的T細胞の増殖をきたさないばかりか、その抗原を発現する細胞に対するT細胞anergyに陥るとされている(Cribben JG. 1996)。白血病細胞においては、その増殖優位性を獲得する機序として多くの遺伝子異常が明らかになっており、このような遺伝子異常により形成された特異的異常タンパク質が発現し、プロセス断片化されたペプチドは細胞表面上MHCの溝に提示されると考えられている。しかし、多くの白血病細胞はこのような白血病特異的抗原を発現しているにも拘らず、その表面におけるCD80/CD86などのco-stimulatory moleculeの発現が不全なことから、白血病に対する有効な免疫反応を惹起することが難しいことが報告されている(Hirano N. 1996)。

【0038】

非常に高い免疫能をもつ抗原提示細胞として樹状細胞(dendritic cell: DC)が最近注目を集めている。DCは生体内に広く分布し、抗原を取りこんだ後、細胞表面に提示しながら、所属リンパ系組織、器官に移動する。その過程において成熟化することにより、未感作ヘルパーT細胞やCTLなどを賦活化し、腫瘍特異的免疫応答を惹起することが知られている(Timmerman JM. 1999, Nestle FO. 1998, Thurner B. 1999, Fong L. 2000)。また、B細胞、ナチュラルキラー細胞(NK細胞)やNKT細胞に作用することも明らかであり、免疫機構全体を制御することのできる最も強力な専門的抗原提示細胞である。最近の腫瘍抗原ペプチドの同定数の増加に伴い、これを治療に応用する際の抗原提示細胞としてDCを用いる試みがなされている。また、腫瘍表面上の抗原ペプチドを用いずDCのみ利用する方法が挙げられる。腫瘍抗原ペプチドを用いる方法として、メラノーマ抗原ペプチドをDC上にloadingして投与方法実際の臨床応用され始めている(Nestle FO. 2001)。しかし、既知の腫瘍抗原ペプチドを用いる方法では、患者のタイプにより異なるペプチドを用意する必要があり、問題点も多い事が指摘されている。そこで、後者のように腫瘍抗原を同定することなしにDCを利用する方法も検討されている。具体的な方法として、酸処理により抽出したペプチドを使用する方法(Zitvogel L. 1996)、腫瘍細胞を溶解したtumor lysateを用いる方法(Flamand V. 1994, Ashley DM. 1997)、腫瘍細胞と樹状細胞とを細胞融合する方法(Gong J. 1997)などがあり、一部臨床応用開始されているものもある。

【0039】

その一方で前述したようにDCの成熟化状態が腫瘍免疫療法において重要であること、DCには形態的および機能的に多くの異なるサブセットが存在する(Banchereau J. 1998)。

ヒトDCは骨髄細胞系(CD11c+)およびリンパ球系(CD11c-)の2種類あり(Caux C. 1996)、DC療法に主に用いられているのは骨髄系DCであり、抹消血中のCD14+単核球またはCD34+造血肝細胞より誘導する方法が一般的になっている。前者はマクロファージ刺激因子(granulocyte-macrophage colony stimulating factor; GM-CSF)とIL-4存在下でDCへと分化し、後者はGM-CSFと腫瘍壞死因子 α (tumor necrosis factor α ; TNF- α)などのサイトカイン存在下でDCへと分化する。これら未成熟DCはさらにin vitroでウイルス由来リボ多糖(LPS)、二重鎖RNA、CpG DNA、CD-40リガンド、サイトカイン(IL-1, IL-2, TNF- α)などの刺激により、成熟DCへの分化が促進されることが知られている。

【0040】

また、最近の知見としてCTLの上昇は認められるが腫瘍拒絶が起こらない理由として、腫瘍近傍に存在しているstroma細胞(乳がん、すい臓がん、胃がんの腫瘍組織の90%以上が間質線維芽細胞よりもなる)により、免疫細胞、炎症細胞の浸潤の妨げになっており、これらの障害を取り除くことにより腫瘍細胞の退縮効果が飛躍的な上昇したことが報告されており(Yu P. 2004)、腫瘍細胞への炎症細胞、免疫細胞の浸潤が腫瘍退縮に関しては重要な要因として考えられるようになってきている。

以上より腫瘍免疫を上手く利用するためには、腫瘍特異的なCTLを如何に効率よく惹起させることができるかにかかっており、その問題点として、以下の点が挙げられる。

- ・腫瘍特異的抗原が同定されているか
- ・腫瘍特異的抗原が同定されてない場合はどうするか
- ・免疫惹起細胞(樹状細胞など)に如何に効率よく抗原提示をさせるか
- ・免疫惹起細胞(樹状細胞など)の成熟を如何に効率よく図るか
- ・以上踏まえた上で如何に腫瘍免疫(CTLを中心とした)を惹起させるか
- ・免疫細胞の腫瘍組織効率的な浸潤

【0041】

【特許文献1】特開2001-302541号公報

【0042】

【特許文献2】特開2002-65278号公報

【0043】

【非特許文献1】Anticancer Res., (19):5367-5374. 1999, Ishida H., Kaneda Y., et al.

【0044】

【非特許文献2】Hum. Gene. Ther., (10):2719-2724. 1999, Zhou WZ., Hoon DSB., et al.

【0045】

【非特許文献3】Gene. Ther., (6):1768-1773. 1999, Zhou WZ., Kaneda Y., et al

【0046】

【非特許文献4】Mol. Ther., (5):291-299. 2002, Tanaka M., Kaneda Y., et al.

【0047】

上記記載のなかで、腫瘍免疫(CTLを中心とした)を惹起させるかが最も重要な要件でありCTLの誘導には免疫惹起を誘発させるアジュバントが必要である。免疫状態をTh1にシフトできるアンジュバントとして「HVJ-電荷型リボソームからなるアジュバント」としての特許公開がされている(特開2001-302541号公報)。その腫瘍ワクチンとしての効果についても報告がなされている(Ishada H. 1999, Zhou WZ. 1999, Tanaka M. 2002)。HVJ-EはHVJをもとの構築されたベクターであり(特開2002-65278号公報)、ベクタービヒクルの中にプラスミド、オリゴDNA・RNA、タンパク質、ペプチド、低分子化合物を封入でき、in vitroおよびin vivoにおいて当該封入試料をベクタービヒクル近傍の細胞へ導入でき、またエンベロープタンパク質であるFタンパク質の働きにより細胞同士を融合させることができ。本発明者らは、上記利点を利用してHVJ-Eを用いた腫瘍免疫について検討を行った。

【0048】

癌の転移の抑制や再発の防止に最も適した遺伝子治療法は免疫遺伝子治療であるが、その効果は世界的にまだ十分に上がっていない。その原因の1つは導入法であり、特に抗原提示の主役である樹状細胞への導入効率の低さ、標的遺伝子導入の不十分さに起因している。もう1つは腫瘍免疫を治療に十分な程度に増強できないことにある。我々はこの課題を実現するために遺伝子導入ベクターや遺伝子発現方法の開発を行ってきた。その結果、不活性化HVJとアジュバントを用いた有効な癌予防ワクチンの開発に成功し、癌転移や再発の抑制が可能になった。具体的には、強力な細胞融合活性を持つ不活性化HVJを用いて樹状細胞とX線照射癌細胞との融合による腫瘍免疫の誘導とさらにアジュバントとしてCpGを併用した腫瘍免疫の増強による癌ワクチンである。

【0049】

本発明の要点は2つある。

1つはHVJの使用である。ただし樹状細胞と癌細胞の融合により癌抗原の提示がなされ腫瘍免疫を誘導できる報告はすでに存在するが、細胞融合法としてはpolyethyleneglycol (PEG)やelectroporation法が用いられてきた。不活性化HVJはこの目的のために用いられたことはないが、既存の方法で報告されている効率に劣ることなく、また生体組織中でも融合を起こすことができる点で優れている。さらにHVJ-E vectorとして用いれば融合と同時に遺伝子導入ができるメリットがあり、これは従来法にはなかった長所である。融合と同時にサイトカインやケモカインなど免疫系を活性化できる遺伝子の導入を行うことにより免疫誘導の増強が可能である。

【0050】

2つめは融合細胞ワクチンとともにアジュバントとしてCpGを投与することによる腫瘍免疫誘導の増強である。この組み合わせは今のところ報告がない。

【0051】

この組み合わせ効果は従来の癌治療の問題点を以下の理由で克服できると考えられる。1つは癌細胞側の問題として、MHC-class Iが多くの癌細胞では欠如しているために癌抗原の提示ができず、樹状細胞に癌抗原が認識されないことがあったが、樹状細胞と癌細胞の融合により抗原提示が効率よくおこりうこと。

2つ目は樹状細胞側の問題として、成熟樹状細胞がnative T細胞に抗原提示できずT細胞の成熟がおこらなかったのであるが、これがCpGを用いたアジュバント効果によってnative T細胞を刺激してTh1へのシフトをおこし抗腫瘍免疫の増強が起こりうこと。

これらの総合的な効果として癌に対する細胞傷害性T細胞が活性化されて腫瘍抑制が可能になると考えられる。

【0052】

ただし後述するようなIn vivoの治療実験においてはまだ改良の余地は残されており、さらに高い融合を起こせる条件やCpGの併用が必要と思われる。またin vivoの融合による治療効果はワクチンだけにとどまらず、癌細胞融合による細胞死の誘発なども考えられる。

【0053】

さらにHVJ-Eを用いた腫瘍免疫を惹起させるために、全身投与したシシプラチンシスプラチニ (CDDP、ランダ注：日本化薬) とHVJ-Eにブレオマイシン (塩酸ブレオマイシン：日本化薬) をHVJ-Eベクターに封入し移植した腫瘍組織中に導入し、効率的な腫瘍免疫を惹起させることができた。

【0054】

以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0055】

in vitro実験

特開2001-286282号公報の実施例8に従い、6,000HAU/600μl(6ウエルプレート6枚分)の

したHVJ-Eベクターを-80°Cから34.5°Cに移した。試料の入ったマイクロチューブを15,000 rpm、15分間、4°Cで遠心し、HVJ-Eベクターを沈殿物として回収し上清を除去した。得られた沈殿物を60μlのブレオマイシン/PBS(5mg/ml)（塩酸ブレオマイシン：日本化薬）溶液に懸濁した。さらに3%のTriton-X100を2μl加え、Triton-X100の最終濃度0.1%の試料を調製し、氷中に15分間放置した。その後、PBS溶液を500μl加えた。マイクロチューブを15,000 rpm、15分間、4°Cで遠心し、沈殿物を取らないよう上清を除去し、PBS溶液を500μl加えた。再度、マイクロチューブを15,000 rpm、15分間、4°Cで遠心し、沈殿物を取らないように上清を除去した。

得られた沈殿物を180μlのPBSに懸濁し、試料溶液を30μlづつ6本のマイクロチューブに分注した。各チューブに5mg/mlに調製したプロタミン硫酸溶液を5μl、さらに500μlのDMEM溶液(Dulbecco変法Eagle培地)を加えた。

投与群として以下のものを調製し、それぞれ比較することによりその効果を評価した。

【0056】

HVJ-ブレオマイシン群：1,000HAU、ブレオマイシン200ng/DMEM 500μl/1 well

HVJ-PBS群：1,000HAU/DMEM 500μl/1 well

1/50ブレオマイシン群：ブレオマイシン50μg/DMEM 500 μl/1 well

1/500ブレオマイシン群：ブレオマイシン5μg/DMEM 500 μl/1 well

1/5,000ブレオマイシン群：ブレオマイシン 500ng/DMEM 500μl/1 well

メデューム群：DMEM

【0057】

6 ウエルプレートに調製したマウス経腸癌細胞CT26に上記試料溶液を加えた。30分間37°Cの保温器中に放置後、培地(DMEM, 10%FCS含有)500μlの交換を行った。37°CのCO2保温器中で2日間保温した。2日後に生細胞数を数え、抗癌効果の評価を行った。

【0058】

その結果を下表および図1に示す。

表1

| 投与群 | 例数 | 平均 | 標準偏差 |
|-----------------|----|---------|--------|
| 1/50ブレオマイシン群 | 2 | 81,800 | 16,688 |
| 1/500ブレオマイシン群 | 2 | 164,600 | 13,859 |
| 1/5,000ブレオマイシン群 | 2 | 196,800 | 15,274 |
| HVJ-ブレオマイシン群 | 2 | 16,800 | 170 |
| HVJ-PBS群 | 2 | 201,100 | 8,627 |
| メデューム群 | 2 | 220,100 | 23,617 |

【0059】

メデューム群、HVJ-PBS各群における平均生細胞数は、220,100個、201,100個であった。培地へのブレオマイシン添加各群(500ng, 5μg, 50μg)の生細胞数は、196,800個、164,600個、81,800個に対して、ブレオマイシンHVJ-E封入群の生細胞数は、16,800個となった。メデュームを100%とし百分率で比較すると、HVJ-PBS群91.4%、ブレオマイシン500ng, 5μg, 50μg添加群89.4%、74.8%、33.9%であるのに対し、ブレオマイシンHVJ-E封入群における生細胞率はわずか7.6%であった。

【0060】

この結果、ブレオマイシンをHVJ-Eに封入することにより劇的な細胞殺傷効果を得ることに成功した。ブレオマイシンの培養液添加時の細胞殺傷効果があまり大きくないことを考えると、HVJ-Eベクターにより直接細胞に導入した場合の効果の大きさが分かる。

本結果は、全身投与により重篤な副作用を引き起こすような抗癌剤をHVJ-Eベクターに封入することによって、患者患部細胞に直接薬剤を運搬できる可能性を示した。

【実施例2】

【0061】

in vivo実験

6,000HAU/600μlのHVJ-Eベクターを-80°Cから34.5°Cに移し急速に可溶化した。

試料の入ったマイクロチューブを15,000rpm、15分間、4°Cで遠心し、HVJ-Eベクターを沈殿物として回収し、上清を除去した。得られた沈殿物を60μlのプレオマイシン/PBS (40mg/ml)溶液に懸濁した。さらに3%のTriton-X100を2μl加えTriton-X100の最終濃度が0.1%となるように調製し、氷中に15分間放置した。

その後、PBS溶液を500μl加えた。マイクロチューブを15,000rpm、15分間、4°Cで遠心し、沈殿物を取らないよう上清を除去し、PBS溶液を500μl加えた。再度、マイクロチューブを15,000rpm、15分間、4°Cで遠心し、沈殿物を取らないように上清を除去した。沈殿物を120μlのPBSに懸濁した。

投与群として以下のものを調製し、それぞれ比較することによりその効果を評価した。

【0062】

HVJ-プレオマイシン投与群：5,000HAU、プレオマイシン6.5μg/100μl/匹

HVJ-PBS投与群：5,000HAU/100μl/匹

65μg/mlプレオマイシン投与群：プレオマイシン/PBS (65μg/ml)、100μl/匹

PBS投与群：100μlのPBS

【0063】

動物実験には、BALB/cマウス(週齢：8週齢、♂)を用いた。経腸癌CT26の移植部位はマウス背部皮内とし、移植癌細胞容量測定のために背部を剃毛した。移植用CT-26細胞は、10%FCS含有DMEM溶液にて調製し、 5×10^6 個(100μl PBS/匹)の細胞を背部に移植した。麻酔は、20倍希釈ネンプタール注射液500μlの腹腔内投与にて行った。移植癌細胞容量は、長径×短径×短径/2の計算法にて見積もった。移植1週間後に腫瘍径が7-8mmとなったところで、上記調製試料100μlを、それぞれマウス癌部に投与した。癌細胞移植後7、10、13、16、19日後(つまり3日毎)に腫瘍系を測り、抗癌効果を評価した。動物数は各群8とした。

【0064】

その結果を下表および図2に示す。(上段：平均、下段：標準偏差)

【0065】

表2

| 投与後日数 | 7 | 10 | 13 | 16 |
|-------------|-------|--------|-------|--------|
| 65μg/ml | 158.4 | 413.70 | 754.7 | 1234.6 |
| プレオマイシン | 25.4 | 71.20 | 206.6 | 332.8 |
| HVJ-プレオマイシン | 136.2 | 285.70 | 456.7 | 676.1 |
| | 16.2 | 77.60 | 116.4 | 209.2 |
| HVJ-PBS | 164.3 | 362.20 | 688.1 | 1083.1 |
| | 23.8 | 73.70 | 143.7 | 243.8 |
| メデューム(PBS) | 158.7 | 418.20 | 738.7 | 1277.7 |
| | 33.3 | 62.50 | 97.9 | 162.7 |

【0066】

また投与16日後における各群の平均腫瘍容量、およびメデューム(PBS)群に対する変化率を図3に示す。

【0067】

調製試料接種時に差が認められなかった腫瘍径に、試料投与3日目以降(図2では10dayに

相当)差が認められた(図2)。9日後(図2では16dayに相当、試料投与9日後)の腫瘍容量は、前述の計算式より算出した結果、PBS投与群: $1,277\text{mm}^3$ 、 $65\mu\text{g}/\text{ml}$ BLM投与群: $1,235\text{mm}^3$ 、HVJ-PBS投与群: $1,083\text{mm}^3$ 、HVJ-BLM投与群: 676mm^3 となった(図2)。百分率比で表すと、PBS投与群: $65\mu\text{g}/\text{ml}$ BLM投与群: HVJ-PBS投与群: HVJ-BLM投与群=0%:3.4%:15.2%:47.1%(図3)となった。プレオマイシンを直接腫瘍患部に投与した群では、PBS投与群に比べて3.4%の腫瘍縮小効果に留まり、ほとんど腫瘍容量の縮小効果が認められなかった。これは、通常行われている全身投与とは異なり腫瘍内部への直接投与によるものか、低濃度投与によるものか、あるいはその他の要因であるかは今回の結果からでは判断できない。HVJ-PBS投与群では腫瘍容量縮小効果が15.2%となり、HVJ-Eベクターのみでもある程度の効果が認められた。これはHVJ-Eにより惹起された免疫作用による抗癌効果がある程度現れたものと予想される。それに比べてプレオマイシン封入投与群では腫瘍容積が47.1%となり、高い抗癌効果が認められた。

【0068】

実施例より、以下のことが示された。

- ・ *in vivo*においては、固形腫瘍細胞にプレオマイシンを直接投与してもほとんど抗癌効果は認められなかった。
- ・ HVJ-Eベクター単独でも、弱い抗癌効果が認められた。
- ・ HVJ-Eにプレオマイシンを封入し固形腫瘍中に直接投与した場合には、優れた抗癌効果が認められた。

【0069】

本発明の実施により、わが国で急速に増加しつつある肺癌、乳癌、胃癌・大腸癌・食道癌などの消化器癌、頭頸部癌(上頸癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌など)、婦人科領域の癌(子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌など)、泌尿器科領域の癌(前立腺癌)、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等すべての固形癌への新たな化学療法が、HVJ-Eベクターを用いることにより可能になる。

【0070】

続けて、本発明による、免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有する医薬組成物が有する優れた効果、特にアジュバントと組み合わせた際に得られるより優れた効果を示すため、さらに実施例を続ける。

【実施例3】

【0071】

マウス骨髄DCは18G針を付着したシリジンに入れたRPMI1640培養液を大腿骨および脛骨の腔に流入し細胞および組織から回収した。当該細胞および組織を $40\mu\text{m}$ 径のメッシュフィルターに通し残渣を除去し、当該細胞中に含まれる赤血球は塩化アンモニウムにて溶血し除去した。

10%血清(Equitech-Bio, Kerrville, TX)を含むRPMI1640培養液で当該細胞を洗浄後、24ウエルプレート(コースター、NY)に1mlの10%血清、 $50\mu\text{M}$ 2-メルカブトエタノールおよび組換GM-CSF(10ng/ml; Genzyme-Tech, Minneapolis, MN)含有RPMI1640培養液(DC培地と呼ぶ)を入れ、 1×10^6 細胞を撒細胞した。

1日おきに培養上清をていねいに除去し、新しい当該培地1mlを添加した。6日後に非/弱接着であるところの樹状細胞を回収し、新たに24ウエルプレートに 1×10^6 細胞を100ng/mlリボ多糖(大腸菌O55:B5、シグマ)を添加したDC培地1mlに撒細胞した。7日目に、非接着樹状細胞を回収し、次の融合実験に供した。フローサイトメトリー分析により、該樹状細胞のうち90%以上はCD11c陽性であった。

【0072】

図4:マウス樹状細胞とマウスマラノーマB16BL6(X線照射)をHVJ(紫外線で不活性化)で融合した。約20%の融合細胞が得られる。A, Bはそれぞれの細胞の脂質を蛍光色素でラベルして樹状細胞と癌細胞の融合像を確認した。Cはそれぞれの表面抗原を認識する抗体を用いて二重染色した。

【0073】

係る試験に供した HVJ (2株) ウィルス は種当該ウイルスを接種した発育鶏卵より得た当該増幅ウイルスを含む尿液を、超遠心により沈殿物として得た。当該ウイルスは使用前にUV 照射 (99 mJ/cm²) による不活化を行った。係る試験使用した細胞、B16BL6 メラノーマ細胞 (H-2b), EL4 T-cell リンフォーマ (H-2b), RENCA細胞 (H-2d), and CT26 大腸がん細胞 (H-2d) はすべてAmerican Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) より購入した。マウス骨髄DCは18G針を付着したシリジンに入れたRPMI1640培養液を大腿骨および脛骨の腔に流入し細胞および組織から回収した。当該細胞および組織を40 μm径のメッシュフィルターに通し残渣を除去し、当該細胞中に含まれる赤血球は塩化アンモニウムにて溶血し除去した。10%血清 (Equitech-Bio, Kerrville, TX) を含むRPMI1640培養液で当該細胞を洗浄後、24ウエルプレート (コースター、NY) に1mlの10%血清、50 μM 2-メルカプトエタノールおよび組換GM-CSF (10ng/ml; Genzyme-Techne, Minneapolis, MN) 含有 RPMI1640培養液 (DC培地と呼ぶ) を入れ、1×10⁶細胞を撒細胞した。1日おきに培養上清をていねいに除去し、新しい当該培地1mlを添加した。6日後に非/弱接着であるところの樹状細胞を回収し、新たに24ウエルプレートに1×10⁶細胞を100ng/mlリボ多糖 (大腸菌O55:B5, シグマ) を添加したDC培地1mlに撒細胞した。7日目に、非接着樹状細胞を回収し、次の融合実験に供した。フローサイトメトリー分析により、該樹状細胞のうち90%以上はCD11c陽性であった。

【0074】

樹状細胞と腫瘍細胞はそれぞれPKH26 (赤) およびPKH67 (緑) に染色し、マウス樹状細胞最適融合活性を調べた。詳細すると樹状細胞はFITCでラベルした抗マウスCD11cモノクローナル抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) および腫瘍細胞であるB16BL6はPEでラベルした抗マウスgp100抗体 (BD Pharmingen, San Diego, CA) を用いて融合活性を調べた。

100 Gy (Gammacell (Nordion International, Ontario, Canada)) を照射した腫瘍細胞 (2×10⁶ 個、250 μl の2 mM CaCl₂を含むBSS溶液:10 mM Tris-Cl pH 7.5, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl) と樹状細胞を (4×10⁶ 個、250 μl の2 mM CaCl₂を含むBSS溶液:10 mM Tris-Cl pH 7.5, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl) とを1:2の割合で混合し、500 μl のBSS溶液にHVJ-E (0-1,000 HAU) 添加し融合能を調べた。混合液は5分間 0°C 静置、37°C 、15分間、120 rpm懸濁した。1.5 mlのBSS溶液中で4°C、1,200 rpm、3分間の遠心操作を2回行い、沈殿した細胞を回収した。当該操作により遊離のHVJ-Eを除去した。その後、24時間37°Cで培養し、細胞を回収し、FACScanにより融合活性を測定した。

【0075】

図5：融合細胞を24時間培養し、その培養上清中のサイトカインをELISA法で測定した。TNF-α, IL-12p40とも融合細胞を用いる方がそれらの細胞の混合物よりもサイトカインを強く分泌した。ここでCpG oligodeoxynucleotidesを用いるとその分泌が増強された。Non-CpG oligodeoxynucleotidesでは分泌が増強されなかった。

10 μg/ml CpG ODN の有無条件下でHVJ を0 HAU (i.e., Mix) あるいは 500 HAU (i.e., FC) にて24時間処理上清試料のTNF-α、およびIL-12p40、IFN-γの濃度をELISA kit (Genzyme-Techne) により測定した。当該試験に使用したCpG配列は、CpG 1668: 5'-TCCATGACGTT CCTGATGCT-3' 、non-CpG ODN (CpG 1668: 5'-TCCATGAGCTTCTGATGCT-3') (Vicari AP 2002 J Exp Med) (Krieg AM, 1995 Nature) であり、Hokkaido System Science (Sapporo, Japan) より合成購入した。

【0076】

図6：融合細胞をマウス皮内に接種し、2週後に脾臓リンパ球を取り出しinterferon-gammaの分泌 (A)、メラノーマに対する細胞傷害性T細胞 (CTL) (B)を測定した。非融合群に比べて強いCTL誘導をみた。さらに腫瘍免疫を強めるためにアジュバントとしてCpGを用いたがこれによってさらに強いinterferon-gammaの分泌とCTL誘導をおこした。

【0077】

(A) 樹状細胞と放射線照射した腫瘍細胞とHVJによって12時間融合 (0 HAU (i.e., Mix) 0-500 HAU (i.e., FC)) させた後、6×10⁶ 細胞を100 μlのPBS溶液に懸濁させた。この際、CpG ODNを使用する場合、100 μgのCpG ODN を100 μl のPBSに溶かし (i.e., CpG alone)

あるいは 6×10^6 個の細胞とともに溶解(i. e., Mix+CpG と FC+CpG)し用いた。各群10匹とし1週間空けて2回皮内投与し免疫した。

【0078】

(B) 免疫10日後に脾臓を回収し3匹分の脾臓細胞を一つに混ぜた。 5×10^6 個の脾臓細胞をマイトマシンC処理した腫瘍細胞と10% FBSを含むRPMI1640培地($50 \mu M$ 2-メルカプトエタノール含有)に20:1の割合で混ぜ37°Cで培養した。5日間培養したエフェクター細胞と $100 \mu Ci$ の ^{51}Cr (Amersham Bioscience, Buckinghamshire England)で、37°C、90分間ラベルしたターゲットとなる腫瘍細胞(1×10^4 個)を様々な比で混ぜ (effector/target (E/T))、37°Cで4時間培養した。4時間後に上清を回収し、遊離した放射線量をMicroBeta Trilux Scintillation Counter (Wallac, Gaithersburg, MD)により測定した。2% Triton X-100で可溶化し放出された ^{51}Cr を100とし、その割合を百分率にて換算した。

【0079】

図7: この融合細胞とCpG投与を1週間隔で2回行ってから10日後に10万個のメラノーマ細胞を反体側の皮内に接種し腫瘍の増殖を調べた(A)。

マウス生存率(B)でもtumor-freeのマウスの割合(C)でも融合細胞とCpGの組み合わせが最も効果的であった。

【0080】

図8: メラノーマは腫瘍関連抗原が既知だが、腫瘍関連抗原が未同定の腎癌細胞(RENCA)を用いてワクチン効果を見たところ融合細胞とCpGの併用が最も効果的であった。

2回のワクチン後、C57BL/6マウスの皮下に 1×10^5 個B16BL6細胞を移植し、BALB/cマウスでは 1×10^5 個のRENCA細胞をワクチン投与の近傍の皮下に移植した。腫瘍細胞移植後、マウス腫瘍径を測定した。腫瘍径が3mm以上になった動物を腫瘍が生着したものとした。腫瘍容量(mm^3)=長径×(短径) $^2/2$ で計算をし、容量が $4000mm^3$ 以上の動物あるいは腫瘍表面が壊死した動物は安樂死させた。腫瘍移植60日後に、腫瘍の観察したC57BL/6 およびBALB/cマウスの皮内にそれぞれ 1×10^5 B16BL6細胞および 5×10^4 EL4細胞、 1×10^5 RENCA細胞および 5×10^4 CT26細胞を移植し腫瘍拒絶について調べた。

【0081】

図9: ワクチン接種後にメラノーマの自然転移モデルを作製した。融合細胞とCpGの併用により肺転移が抑制された。

2回ワクチン後、C57BL/6マウスの右支脚皿皮内に 5×10^5 B16BL6細胞を $50 \mu l$ のPBS溶液に懸濁し移植した。腫瘍21日後に原発巣の直径が10mm超になったところで右股関節離断術によって鼠けい部リンパ節、膝かリンパ節を除去した。全てのマウスは右下肢切断手術21日目に安樂死させ、肺を摘出しブアン液で固定後、実体顕微鏡下において肺転移個数をカウントした。

【0082】

Table 1: 腫瘍拒絶マウスの対する腫瘍の再接種実験

2種の腫瘍細胞の観察マウスに対して、同種細胞および同系異種細胞の再投与を試みた。C57BL/6観察マウスに対して 1×10^5 個のB16BL6あるいはRENCA細胞をBALB/cマウスに対して 5×10^4 個のEL4あるいはCT26細胞を移植した。

60日後の観察マウス数をTable 1に記載した。融合細胞とCpG-ODNによる免疫動物はB16細胞およびRENCA細胞をそれぞれ拒絶したが、同系異種細胞であるEL4細胞およびCT26細胞をそれぞれ拒絶することは出来なかった。

しかし、RENCA細胞との融合細胞でのみ免疫した動物はRENCA細胞再投与動物中の40%程度の拒絶率であった。

【実施例4】

【0083】

(1) 試験デザイン

マウス大腸癌由来CT-26細胞(5×10^6 細胞)を、8週齢のBALB/cAnNCrj系雄マウスの背部皮内に移植した。5日後に腫瘍径(長径)が5mm程度となった動物の腹腔内に0.2mg/bodyのブラトシン注(シスプラチン、CDDP)を腹腔内に単回投与した。投与後にHVT-E、あるいはブ

レオマイシン $6.5\mu\text{g}$ を含有するHVJ-E/BLMを腫瘍内に単回（投与翌日）あるいは3回（投与1, 5, 8日後）投与した。腫瘍径、生存曲線、腫瘍組織における免疫反応について検討を加えた。

【0084】

（試験1.）（1）対照群、（2）HVJ-E群、（3）BLMのみ群、（4）HVJ-E/BLM群、（5）CDDPのみ群、（6）CDDP HVJ-E/BLM単回投与群の21日後の腫瘍容量について検討を行った。なお、本試験での群構成を以下に示す。

| 群 | 比較対照物質 | | 被験物質 | |
|---|---------------------|--|---------------------|--|
| | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 ($\mu\text{g}/\text{腫瘍}$)** | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 ($\mu\text{g}/\text{腫瘍}$)** |
| 対照群 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| HVJ-E群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E 0 | 生理食塩液 0 | HVJ-E 0 |
| $6.5\mu\text{g}$ BLM/tumor | 生理食塩液 0 | BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | BLM 6.5 |
| $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| 0.2mg/body CDDP群 | CDDP 0.2 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| 0.2mg/body CDDP- $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |

*: シスプラチニン (CDDP) として

**: レオマイシン (BLM) として

【0085】

（試験2.）（1）対照群、（2）CDDP HVJ-E/BLM単回投与群（単回）、（3）CDDP HVJ-E/BLM3回投与群の21日後の腫瘍容量について検討を行った。さらにCDDPの投与、15日後に初回腫瘍細胞移植隣接部にCT-26細胞（ 5×10^6 細胞）を皮内移植し、再移植細胞に対する拒絶について検討した。

| 群 | 比較対照物質 | | 被験物質 | |
|--|---------------------|--|---------------------|--|
| | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 ($\mu\text{g}/\text{腫瘍}$)** | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 ($\mu\text{g}/\text{腫瘍}$)** |
| 対照群 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| 0.2mg/body CDDP- $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| 0.2mg/body CDDP- $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 $\times 3$ | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 $\times 3$ | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 $\times 3$ |

【0086】

（試験3）腫瘍組織におけるCD-4、CD-8等の浸潤と調べるために以下に示す、試験群を設定し、CDDP投与9日後に腫瘍組織を摘出し、組織免疫染色を実施した。

| 群 | 比較対照物質 | | 被験物質 | |
|--|---------------------|--|---------------------|--|
| | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 ($\mu\text{g}/\text{腫瘍}$)** | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 ($\mu\text{g}/\text{腫瘍}$)** |
| 対照群 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| HVJ-E群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E 0 | 生理食塩液 0 | HVJ-E 0 |
| $6.5\mu\text{g}$ BLM/tumor | 生理食塩液 0 | BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | BLM 6.5 |
| $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| 0.2mg/body CDDP群 | CDDP 0.2 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| 0.2mg/body CDDP- $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| 0.2mg/body CDDP- $6.5\mu\text{g}$ /tumor HVJ-E/BLM群 $\times 3$ | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 $\times 3$ | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 $\times 3$ |

【0087】

（2）実験方法

2-1) 腫瘍細胞の培養

マウス大腸ガン由来CT-26細胞を、10%FBS含有DMEM培地を用い、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

75cm²のフラスコを用いて細胞培養を行った。約80%コンフルエントに達した後、継代培養を行った。DMEM(10%FBS含有)液を除去後、10mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を洗浄し、1mLの0.25%トリプシンおよび1mmol/L EDTA-2Na含有PBSを添加し、37℃で細胞を剥離した。9mLのDMEM培地を添加後、細胞を集め、遠心分離(1000 rpm, 5分間)にて細胞を回収した。上清除去後、10%FBS含有DMEM培地にて細胞を希釈し、培養した。

【0088】

2-2) 腫瘍細胞懸濁液の調製

約80%コンフルエントに達した細胞の培養液を除去後、PBSを用いて、培養フラスコを洗浄した。0.25%トリプシンおよび1mmol/L EDTA-2Na含有PBSを少量添加し、37℃で細胞を剥離し始めるまで放置した。DMEM培地を用いて細胞を集め、遠心分離(1000 rpm, 5分間)した。上清を除去後、PBSに懸濁した。再度遠心分離(1000 rpm, 5分間)し、上清を除去後、PBSを用いて5×10⁷個/mLに調製した。

【0089】

2-3) マウスの馴化

16日間の検疫馴化期間中、固型飼料および飲水を自由に与えた。

【0090】

2-4) 腫瘍細胞の接種

検疫馴化が終了した動物にバリカンを用いて剃毛を実施した。マウスの背部に、ディスポーザブル注射筒および注射針(26G)を用いて、100 μL/site(5×10⁶個/body)を59匹の動物に皮内投与した。投与した翌日に57匹の動物(未投与動物)に同様に投与した。

【0091】

2-5) 動物の群分け

腫瘍の径(長径、短径)を、移植後5日目に測定(群分け後は測定しなかった)した。5日後に腫瘍径(長径)が5mm程度になった動物を、平均腫瘍径(長径)がほぼ均一になるよう、層別無作為化によって群分けした。

【0092】

2-6) 投与

ディスポーザブル注射筒および注射針を用いて、各群、対照物質を1回腹腔内投与(1000 μL)し、その1日後に被験物質を腫瘍内投与(100 μL)した。

【0093】

2-7) 腫瘍径の測定

投与日を投与後0日とした。投与後3, 6, 9, 12, 15, 18および21日に、全例について腫瘍径を計測し、腫瘍体積(長径×短径×短径÷2)を算出した。

【0094】

2-8) 腫瘍重量の測定

各群全例、投与後21日(絶食16~24時間後)に、ペントバルビタールナトリウム(東京化成工業株式会社)水溶液(6.48mg/mL, 5mL/kg)の腹腔内投与による麻酔下で放血安楽死させた後、腫瘍を摘出し、組織染色等を実施した。

【0095】

2-9) 腫瘍組織染色を液体窒素中で凍結した。腫瘍組織をクライオスタットで8 μm厚切片を作製した。組織切片を-20℃の冷アセトン中で15分間固定した。水洗後内因性アビシン・ビオチンのブロッキングを行い水洗した。試料を正常ウサギ血清により反応を行い、50倍希釈した一次抗体(抗マウスCD8a・ラット抗体(Ly-Z; Pharmingen)、抗マウスCD4a・ラット抗体(L3T4; Pharmingen))と4℃、一晩反応させた。7.5mMトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄後、300倍希釈した抗ラット・ビオチン標識ウサギIg(DAKO)と30分間反応させた。9.5mMトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄後、100倍希釈のストレプトアビシンと30分間反応させた。11.5mMトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄後、ファーストトレッドにより発色させた。水洗後ヘマトキシリンで核染色を行った。

【0096】

結果)

試験1の結果)

(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP、HVJ-E/BLM単回投与群の腫瘍容量を測定した。

第6群の試験では5匹づつ2回に分けて試験を行い、10匹中2匹のマウスで観察した。5匹の腫瘍径の平均値をグラフにした。それぞれの平均腫瘍容量は、(1)対照群: 1641mm^3 、(2)HVJ-E群: 1386mm^3 、(3)BLMのみ群: 1303mm^3 、(4)HVJ-E/BLM群: 718mm^3 、(5)CDDPのみ群: 387mm^3 、(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群: 51mm^3 となった。対照群の平均腫瘍容量を100%とし、各群の平均値を比較すると、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群はそれぞれ、82.9%、80.0%、43.0%、23.2%、3.1%であった(図10)。

【0097】

試験2の結果

(1)対照群、(2)CDDP、HVJ-E/BLM単回投与群、(3)CDDP、HVJ-E/BLM3回投(CDDP投与後のHVJ-E/BLM投与日、1, 5, 8日後)与群を作製した。CDDPを投与15日後にCT-26細胞を接種し、腫瘍の拒絶について調べた。

まず、CDDP投与15日後では、(2)群で4匹中1匹のマウスで観察が認められた。(3)群では5匹中2匹で観察が認められた。本群において、あと2匹で15日以降に観察が認められた(図11)。同系腫瘍細胞再投与試験で、(2)群で4匹中1匹のマウスで、(3)群では5匹中4匹で拒絶が認められた。腫瘍免疫が惹起されていることが確認された。

【0098】

試験3の結果)

(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP、HVJ-E/BLM単回投与群、(7)CDDP、HVJ-E/BLM3回投与群

試験3の試験において、CDDP投与9日後の腫瘍組織をとり組織切片を作製した。(1)対照群では核分裂細胞が多く、また核密度が高いという腫瘍細胞に特異的な悪性細胞所見が認められた。腫瘍組織の中心部ではネクロティックな細胞死が認められた。大半がsarcoma細胞特有の形態、つまりCT-26細胞の旺盛な増殖像が認められる。CD-4およびCD-8(図12, 13)陽性像はほとんど見られなかった。(2)HVJ-E群においても総体的に(1)対照群とほぼ同じであり、HVJ-Eを投与した針跡近傍で好中球の浸潤が認められた。(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群においても、ほぼ同様の所見であった。

【0099】

前者に比べて(5)CDDPのみ群では、腫瘍組織の広範にわたって腫瘍細胞の壊死像が認められた。これは腹腔内投与したCDDPが血管等を通じて腫瘍組織に広がり、CDDPの抗がん剤としての効果により腫瘍細胞を排除していると考えられた。しかし、CDDPのみの投与ではまだ腫瘍細胞を壊滅させることはできず、一部に腫瘍細胞が残っていた。(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群では、総体的に腫瘍細胞が少くなり、かなりの腫瘍細胞は消滅している。本試料の回収日はCDDP投与9日目であり、まだ観察状態に至っておらず、本試料が観察できうるかどうかは不明である。ただ、CD-4およびCD-8陽性細胞数(図12, 13)は増加しているが、後述のHVJ-E/BLMの連続投与に比べると少ない。(3)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群では、腫瘍細胞はほとんどなく、抗原線維が変性壊死を起こし液状状態の部位が認められた。総体的に細胞数が少なく、広範に好中球の浸潤が認められた。特徴的なことは、他では認められなかった、CD-4およびCD-8陽性像(図12, 13)がこれも広範に認められたことが特徴として挙げられる。腫瘍組織に浸潤するCD-8陽性細胞のほとんどはCTL細胞であることが報告されており、(3)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群で、腫瘍の観察はCTLによるものであると予想された。

【0100】

本実施例では(1)樹状細胞によるワクチン効果がCpG-ODNを添加することにより上昇した点、と(2)HVJ-E/BLMの腫瘍内投与とCDDPの全身投与の相乗効果により抗腫瘍免疫が惹起され

たことが示された。

また本発明の特徴として、以下を挙げることができる。

- ・腫瘍の寛解が認められた。
- ・寛解の理由の一つとして、CD-8陽性細胞の腫瘍組織への浸潤、つまり腫瘍細胞特異的なCTLによる効果が考えられる。
- ・HVJ-E/BLMあるいはCDDP単独投与のみでは効率のよい腫瘍免疫が惹起できないことから併用が重要である。
- ・CDDP投与でCDDPの効果は弱いながらも腫瘍組織全体に行き渡り、その後のHVJ-E/BLM投与により、CDDPにより脆弱となった腫瘍組織にHVJ-E/BLMが効率よく送達されその効果を発揮した。
- ・その際、HVJ-Eは腫瘍免疫を惹起するアンジュバンドとして作用する。

【0101】

免疫染色図の説明

図14および図15のHE染色図に対する説明

ControlではCT-26がん細胞の、核密度が高い、hyper chromatin、核の大きさの不揃い、核分裂が多い等の悪性所見像が認められる。この現象はHVJ-E、BLM、HVJ-E/BLM投与時にも多少の差はある同様の所見が認められた。壊死部分での好中球、マクロファージの浸潤像が認められた。CDDP投与の試料では空胞変性が認められ好中球、マクロファージ等ががん細胞中に浸潤しており、係る細胞ががん細胞を取り囲んでいる様子が見受けられる。CDDP+HVJ-E/BLMの単回投与では、腫瘍細胞数が少なくなり、リンパ系細胞が多く認められる。HE染色の濃さが薄くなり、よりピンクな像となっている。これは細胞中の核酸濃度が低下している証拠であり、がん細胞の細胞密度が低下していることによるものであると考えられる。CDDP+HVJ-E/BLMの3回投与では、ほとんどがん細胞が認められず、あっても分裂像は少なく増殖性を失っている。変性壊死している部分が多く炎症性細胞の浸潤も広範囲に認められ、リンパ球系細胞も多く認められる。

【0102】

図16および図17のHE染色図に対する説明

腫瘍免疫による抗腫瘍効果の一つとしてCTLが考えられる。よって、腫瘍内にCTL細胞が実際に浸潤しているかどうかについて、CD8細胞（腫瘍組織に浸潤するCD8陽性細胞はそのほとんどがCTL細胞であることが報告されている）浸潤について検討を行った。

Control、HVJ-E、BLM、HVJ-E/BLM投与ではCD8陽性の細胞は散在性に認められるが、数としてはそれほど多くない。CDDP投与では陽性数が増加し広範囲におよんである。CDDP+HVJ-E/BLMの単回投与ではCD8陽性数がさらに増え陽性染色の強度が高まっている。

CDDP+HVJ-E/BLMの3回投与では、他と明らかに異なり、CD8陽性細胞はびまん性に存在し染色性も非常に高い。よって、CT26細胞特異的なCTLの誘導によりCT26腫瘍細胞が壊死していることが判明した。

これらの知見により、CDDP+HVJ-E/BLMの繰り返し投与により、抗腫瘍免疫が惹起される、rechallengeによる腫瘍の拒絶も本作用であると考えられる。

【0103】

本発明について、さらに詳しく述べる。

本発明は、生体内で抗腫瘍免疫を惹起するためのビヒクルに関する。より詳しくは、ウイルス、不活性化ウイルス、特に不活性化HVJ（センダイウイルス）に、化学療法剤、好ましくは抗がん剤を封入し固形腫瘍内に導入し、さらに抗癌剤全身投与と併用することにより、より高い抗腫瘍免疫を惹起させることに関する。

【0104】

現在のがん治療における治癒率は約50%程度といわれ、その治癒は一般的には外科療法や放射線療法など局所療法によりもたらされる場合が多い。特に固形癌の治療においては、全身療法である化学療法が単独で治癒に貢献する割合は極めて少なく、各種療法と併用されるのが通常である。

【0105】

一方外科療法では、全ての臓器癌の手術が可能となり、治療法として既に完成域に達していると考えられ、これ以上の治癒率向上は望めない。また放射線療法も感受性のある臓器癌の治療成績がほぼ一定率に達しており、同様にこれ以上の治癒率向上は望めない。

【0106】

従ってこれらの治療法により、今後の癌治癒率の大幅な向上は期待しかいたため、癌の治癒率を現状の50%からさらに改善し癌制圧に達するには、より優れた化学療法の開発が欠かせない。

【0107】

化学療法に使用される抗癌剤は、癌細胞のような増殖能の高い細胞の殺細胞効果を目的としており、正常細胞、特に細胞増殖能の高い骨髄細胞等に与えるダメージが大きく、その結果患者に与える苦痛も大である。これは抗癌剤の送達法が注射剤による全身への投与であり、がん細胞以外の正常細胞にも抗癌剤が到達し、正常細胞が殺傷されホメオスタシスが機能しなくなるためである。

【0108】

しかし現状では、抗癌剤を単独投与した際の効果は概ね30%程度であるとされており、ゲノムの遺伝子情報解析研究が進められ適切な抗癌剤の選定が今後可能なることも期待されているが、現時点での抗癌剤療法は効果と比較して副作用が高いといわれている。

【0109】

これは抗癌剤全身投与により正常細胞がダメージを受けたためである。よって、癌組織特異的な抗癌剤の導入、加えて癌細胞への取り込み方法が確立できれば、理想的な抗癌剤の送達システムとなる。さらに、抗癌剤のベシクル(vesicle)への封入が可能になれば、標的臓器・細胞選択的に、しかも正常細胞への影響(副作用)が少ない治療法を確立できる。また、これにより副作用が強く開発を断念した抗癌剤の再評価に結びつくものと考えられる。

【0110】

本発明者らは上記問題を解決すべく鋭意検討した結果、化学療法剤を封入したウイルスエンベロープベクターを有効成分として含有する医薬組成物を完成させることができた。

さらに臨床応用により近い方法として、抗癌剤をウイルスエンベロープベクターに封入し直接腫瘍に導入し、他の抗がん剤との併用により、HVJ-Eのアジュバント作用にも起因する腫瘍細胞特異的な抗腫瘍免疫を惹起でき、腫瘍を退縮させることができた。

【0111】

従って本発明は具体的には例えは、外来遺伝子の封入能を有する不活性化HVJ-Eベクター等の中に、抗癌剤等を封入した医薬組成物を提供するものである。

さらに、腫瘍に抗癌剤を含有したHVJ-Eベクター等を導入し、抗癌剤投与との併用によりベクター自身のアジュバント作用にも起因する高い抗腫瘍免疫を惹起し、腫瘍を退縮させる方法を提供するものである。

【0112】

以下に、本発明を詳細に説明する。

【0113】

本発明により副作用が大きな抗癌剤を、簡便しかも安全に癌部に送達できる方法が提供される。

さらに、抗原提示細胞と腫瘍細胞を融合させ効果的な抗腫瘍免疫を惹起させることができる方法が提供される。

【0114】

本発明において使用される化学療法剤とは、細胞に直接作用する低分子化合物であれば限定されないが、例えは東京化学同人刊・生化学事典第3版には、「現在、選択毒性の高い化学物質を用いる治療法すなわち化学療法の対象は微生物による感染症のみならず悪性腫瘍にまで広げられている。」と記載されており、抗菌剤、抗癌剤等が含まれることは論を待たない。

【0115】

なお本発明においては、化学療法剤としてより好ましくは制癌剤、抗癌剤または抗腫瘍剤(以下、抗癌剤と総称)を挙げることができ、抗癌剤としてさらに具体的には例えは、ブレオマイシン類、アドリアマイシン・ダウノマイシンのアントラキノン系制癌剤、マイトイマイシン類、アクチノマイシン類、イリノテカン等のカンプトテシン類、シスプラチニ類、ストレプトゾトシン、5-フルオロウラシル(5-FU)およびその誘導体、ピラルビシンおよびそれらの薬理学的に許容される塩を挙げることができる。

【0116】

これら化学療法剤の中でも、さらに好ましくはブレオマイシン類を挙げることができ、具体的にはブレオマイシン(Bleomycin)またはその薬理学的に許容される塩、あるいはペブロマイシン(Peplomycin)またはその薬理学的に許容される塩を挙げることができ、さらに詳しくは塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペブロマイシンを挙げることができる。

【0117】

本発明にかかる医薬組成物を抗癌剤として使用する場合、適応となる癌の種類は限定されず、具体的には固形癌、血液細胞癌等を挙げることができる。これらの中でも固形癌が好適対象である。

【0118】

固形癌としてより具体的には、例えは肺癌、乳癌、消化器癌、頭頸部癌、婦人科領域の癌、泌尿器科領域の癌、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等を挙げることができ、さらに具体的には、例えは消化器癌として胃癌、大腸癌、食道癌等を、頭頸部癌として上頸癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌等を、婦人科領域の癌として子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌等を、泌尿器科領域の癌として前立腺癌等を挙げることができる。

【0119】

これらの固形癌の中でも、より好適な対象としては、皮膚癌、皮膚悪性腫瘍、頭頸部癌(上頸癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、口腔癌など)、肺癌(特に原発性および転移性扁平上皮癌)、食道癌、悪性リンパ腫(細網肉腫、リンパ肉腫、ホジキン病など)、子宮頸癌、神経膠腫、甲状腺癌、前立腺癌を挙げることができる。

【0120】

次に本発明におけるウイルスエンベロープベクターとは、ウイルスからRNAまたはDNAを取り除いた膜であり、通常は遺伝子、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、プラスミド等を封入して細胞移入(transfection)に利用されるものである。

【0121】

ウイルスの種類も限定されないが具体的には、例えはレトロウイルス科、トガウイルス科、コロナウイルス科、ラビウイルス科、バラミクソウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、ラブドウイルス科、ボックスウイルス科、ヘルベスウイルス科、バキュロウイルス科、およびヘパドナウイルス科からなる群から選択される科に属するウイルスを挙げることができる。

本発明にかかるウイルスとしてさらに具体的には、例えはセンダイウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルベスウイルス、ワクシニアウイルス、ボックスウイルス、インフルエンザウイルス等を挙げることができる。

【0122】

これらの中でも、好ましくはマウス肺炎ウイルスの一つであるセンダイウイルス(Hemagglutinating Virus of Japan、以下 HVJ)を挙げることができる。

【0123】

なおセンダイウイルスとして具体的には、例えはVR-105、VR-907等をAmerican Type Culture Collection (ATCC。住所: P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, TEL [1]-703-365-2700) から購入することができる。

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,152376,VR-105&text=Sen dai&max=20>

<http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm?view=av,1375478,VR-907&text=Se>

ndai&max=20

【0124】

ウイルスエンベロープベクターについてより詳しくは、例えば特開2001-286282号公報(W001/57204号公報)、特開2002-065278号公報、W003/014338号公報等に記載されており、具体的には例えば特開2001-286282号公報の実施例8などに従って調製することができる。

【0125】

なお化学療法剤をウイルスエンベロープベクターに封入する工程においては界面活性剤を使用することが好ましく、界面活性剤として具体的には、例えばトリトン(Triton)X100、デオキシコール酸またはその塩、コール酸またはその塩等を挙げることができる。デオキシコール酸の塩として好ましくはデオキシコール酸ナトリウム、コール酸の塩として好ましくはコール酸ナトリウムを挙げることができる。

【0126】

本発明にかかる医薬組成物の剤型は限定されないが、具体的には例えば注射剤、軟膏等を挙げることができ、好ましくは注射剤である。

【0127】

続いて不活性化センダイウイルス・エンベロープベクター(以下、HVJ-Eベクター)の場合を例にとって、より詳細に説明する。

【0128】

HVJ-Eベクターに抗癌剤を封入する場合には、抗癌剤を緩衝液に溶解する。ここで使用する緩衝液は限定されず、具体的には例えば、TE緩衝液(10mMトリス、1mM EDTA[pH8.0])、PBS(リン酸緩衝液)等を適宜選択し使用できるが、pHが6-9の緩衝液が好ましい。

【0129】

本発明の特長として、副作用あるいは毒性の強い抗癌剤をHVJ-Eベクターに封入し、*in vitro*実験では培養液中に抗癌剤がもれることなく直接細胞に抗癌剤を送達することができる。

【0130】

また*in vivo*動物実験においては、抗癌剤の全身投与ではなく、局所投与を行うことが可能であり、固体癌の癌細胞のみに効率よく抗癌剤を送達することができる。

【0131】

さらに人の治療においては、抗癌剤封入HVJ-Eベクターの単独投与による化学療法だけではなく、進行癌患者で抗癌剤の投与不能な患者に対し局所投与を行うことにより癌の退縮を図り、さらに放射線治療、外科的処理との併用により、一層優れた抗癌効果が得られる。

【0132】

抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターは、*in vitro*実験ではホスト細胞にトランスフェクションする。その場合の手続きは、例えば抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターの溶液を培養細胞の培地に添加するなどの方法を採用することができる。

【0133】

トランスフェクションは37°Cで反応させる場合、30分以上、48時間程度とする。効果判定は生細胞数のカウントあるいはWST assay(生細胞のカウント手法：cell counting kit-8、同仁化学)により行うのが好ましい。

【0134】

*in vivo*動物実験における対象は、例えばマウスの場合、癌細胞が同系移植では免疫不全マウスではない通常マウスを、異種移植の場合はヌードマウスあるいはSCIDマウスを使用するのが好ましい。

【0135】

ペトリディッシュで培養した培養癌細胞をマウスの皮内に移植し、移植細胞が増殖後、抗癌剤を封入したHVJ-Eベクターを増殖固体癌部内に投与し、癌部の長径および短径を測定し、その抗癌効果測定をするなどの方法を採用することができる。

【0136】

続いて、さらに本発明を詳述する。

近年、悪性腫瘍に対する治療成績は化学療法を中心とする集学的治療の進歩によって著しく向上している。特に白血病や悪性リンパ腫などの造血器腫瘍においては、造血肝細胞移植などとの併用により治癒も十分に期待できるものとなっている。しかし、抗がん剤や放射線治療などによる毒性効果のみしか認められない場合があり、腫瘍細胞撲滅には限界がある。免疫機構による選択的腫瘍細胞排除が重要であることが基礎的研究ならびに臨床的観察より明らかになってきている。免疫機構は粘膜、非粘膜器官を問わずタンパク質（ペプチド）および糖質、脂質等の非ペプチド抗原を認識して作用する。病原体進入の際、主に単球が進入局所に遊走し、食食作用などを介して抗原に非特異的な防御応答を行う。糖質や脂質などの非ペプチド等に対する自然免疫がまず惹起され、病原体排除に関する種々の因子の産生を帮助する。その後病原体ペプチドを認識するリンパ球が増殖、分化し、Bリンパ球は抗体産生細胞に分化し、Tリンパ球が免疫系をコントロールするヘルパーT細胞や細胞性障害T細胞などに分化し抗原特異的免疫応答、いわゆる獲得免疫を誘導する。獲得免疫には抗体が主体をなす体液性免疫とTリンパ球が主体となる細胞性免疫がある。免疫が細胞性免疫あるいは体液性免疫のどちらが主導になるかは、ヘルパーT細胞の2つの亜集団である、Th1あるいはTh2のどちらが優位になるかによって決定される。免疫状態がTh1に傾けば細胞性免疫が優位になり、一方Th2に傾けば体液性免疫が優位になる。両者はお互いの免疫バランスの上に成り立っており、これら免疫状態は種々の細胞が分泌する液性分子であるサイトカインに依存している。Th1型サイトカインとしてIL-12、IFN γ などが、一方Th2型サイトカインとして、IL-4、IL-5などが挙げられる。

【0137】

免疫、特に腫瘍免疫を考える場合には、CD8陽性細胞障害性T細胞(CTL)およびCD4陽性ヘルパーT細胞が非常に重要な役割を果たしていることが報告(North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991, Pardoll DM. 1998)されている。特に免疫された動物のCD8陽性T細胞(CTL)は、*in vitro*で直接標的細胞を障害し(Wanger H. 1980)。養子免疫による非免疫動物に腫瘍抵抗性を持たせることができた(North RJ. 1984, Greenberg PD. 1991)との報告がなされている。したがって、腫瘍特異的CTLをいかに効率よく誘導できるかが抗腫瘍療法の開発において重要である。CTLによる抗腫瘍免疫はT細胞レセプターを介して、腫瘍細胞表面に発現された主要組織抗原(major histocompatibility complex: MHC)クラスI分子と腫瘍抗原由来ペプチドの複合体をCTLが認識し、バフォーリン等を腫瘍細胞に導入することによって細胞障害性を発揮する。腫瘍特異的CTL誘導には、まず腫瘍細胞特異的に発現され、細胞内でプロセスされてペプチド断片としてMHCに提示されうる標的抗原ペプチドを同定することに主眼が置かれ、Serological Analysis of Recombinant cDNA Expression Library (SEREX)法により高力値のIgG抗体を産生する多くのペプチド分子が見出されている。

【0138】

しかし、腫瘍ペプチドの同定のみで腫瘍免疫を語ることは困難である。同定されたペプチドを*in vivo*で細胞表面上に如何に効率よく提示させるかという点、co-stimulatory moleculeであるCD80/CD86の発現など、残されている課題は多い。詳述すれば、効率的に当該ペプチドを発現させてもco-stimulatory moleculeであるCD80/CD86などの発現が低く、抗原シグナルのみが伝わった場合は抗原特異的T細胞の増殖をきたさないばかりか、その抗原を発現する細胞に対するT細胞anergyに陥るとされている(Gribben JG. 1996)。白血病細胞においては、その増殖優位性を獲得する機序として多くの遺伝子異常が明らかになっており、このような遺伝子異常に形成された特異的異常タンパク質が発現し、プロセス断片化されたペプチドは細胞表面上MHCの溝に提示されると考えられている。しかし、多くの白血病細胞はこのような白血病特異的抗原を発現しているにも拘らず、その表面におけるCD80/CD86などのco-stimulatory moleculeの発現が不全なことから、白血病に対する有効な免疫反応を惹起することが難しいことが報告されている(Hirano N. 1996)。

【0139】

また、最近の知見としてCTLの上昇は認められるが腫瘍拒絶が起こらない理由として、腫瘍近傍に存在しているstroma細胞（乳がん、すい臓がん、胃がんの腫瘍組織の90%以上が間質線維芽細胞よりなる）により、免疫細胞、炎症細胞の浸潤の妨げになっており、これらの障害を取り除くことにより腫瘍細胞の退縮効果が飛躍的な上昇したことが報告されており（Yu P. 2004）、腫瘍細胞への炎症細胞、免疫細胞の浸潤が腫瘍退縮に関しては重要な要因として考えられるようになってきている。

以上より腫瘍免疫を上手く利用するためには、腫瘍特異的なCTLを如何に効率よく惹起させることができるかにかかっており、その問題点として、以下の点が挙げられる。

- ・腫瘍特異的抗原が同定されているか
- ・腫瘍特異的抗原が同定されてない場合はどうするか
- ・免疫惹起細胞（樹状細胞など）に如何に効率よく抗原提示をさせるか
- ・免疫惹起細胞（樹状細胞など）の成熟を如何に効率よく図るか
- ・以上踏まえた上で如何に腫瘍免疫（CTLを中心とした）を惹起させるか
- ・免疫細胞の腫瘍組織効率的な浸潤

【0140】

【特許文献1】特開2001-302541号公報

【0141】

【特許文献2】特開2002-65278号公報

【0142】

【非特許文献1】Anticancer Res., (19):5367-5374. 1999. Ishida H., Kaneda Y., et al.

【0143】

【非特許文献2】Hum. Gene. Ther., (10):2719-2724. 1999. Zhou WZ., Hoon DSB., et al.

【0144】

【非特許文献3】Gene. Ther., (6):1768-1773. 1999. Zhou WZ., Kaneda Y., et al

【0145】

【非特許文献4】Mol. Ther., (5):291-299. 2002. Tanaka M., Kaneda Y., et al.

【0146】

上記記載のなかで、腫瘍免疫（CTLを中心とした）を惹起させるかが最も重要な要件でありCTLの誘導には免疫惹起を誘発させるアジュバントが必要である。免疫状態をTh1にシフトできるアンジュバントとして「HVJ-電荷型リボソームからなるアジュバント」としての特許公開がされている（特開2001-302541号公報）。その腫瘍ワクチンとしての効果についても報告がなされている（Ishada H. 1999, Zhou WZ. 1999, Tanaka M. 2002）。HVJ-EはHVJをもとの構築されたベクターであり（特開2002-65278号公報）、ベクタービヒクルの中にプラスミド、オリゴDNA・RNA、タンパク質、ペプチド、低分子化合物を封入でき、in vitroおよびin vivoにおいて当該封入試料をベクタービヒクル近傍の細胞へ導入でき、またエンベロープタンパク質であるFタンパク質の働きにより細胞同士を融合させることができ。本発明者らは、上記利点を利用してHVJ-Eを用いた腫瘍免疫について検討を行った。

【0147】

癌の転移の抑制や再発の防止に最も適した遺伝子治療法は免疫遺伝子治療であるが、その効果は世界的にまだ十分に上がっていない。その原因のひとつとしては腫瘍免疫を治療に十分な程度に増強できないことが推察される。我々はこの課題を実現するために遺伝子導入ベクターや遺伝子発現方法の開発を行ってきた。その結果、不活性化HVJのアジュバント作用と抗がん剤を当該ベクターに封入し固形腫瘍に直接投与し、他の抗がん剤の併用投与により腫瘍特異的な抗腫瘍免疫を惹起させることを可能となった。その際腫瘍特異的抗原ペプチドを必要としない、換言すれば腫瘍ペプチドが同定されていない広範な腫瘍に応用可能である。さらにCTLが惹起されているにもかかわらず、固形腫瘍組織を取り巻く

troma細胞等により腫瘍部位にCTL細胞が到達することができず、固体腫瘍の腫瘍細胞を殺傷できないことによって、腫瘍退縮が認められないという局面をHVJ-Eと抗がん剤との併用により打破することができるという画期的な発明であると考えられる。

【0148】

本発明の要点は3つある。

1つはHVJの使用である。HVJのアジュバント効果によって免疫状態をTh1へシフトさせ腫瘍免疫の惹起を誘導させること。

【0149】

2点目としてHVJ-Eを用いた腫瘍免疫を惹起させるために、全身投与したシシプラチンシスプラチニン(CDDP、ランダ注：日本化薬)とHVJ-Eにブレオマイシン(塩酸ブレオマイシン：日本化薬)をHVJ-Eベクターに封入し移植した腫瘍組織中に導入し、効率的な腫瘍免疫を惹起させることができた点にある。

【0150】

さらに3点目として、惹起されたCTL細胞を非常に効率よく固体腫瘍中に集積できることが挙げられる。

また、誘導された腫瘍免疫は同種腫瘍細胞を排除するとう免疫本来の働きも保持しており、当該作用により転移した腫瘍の排除、さらには固体腫瘍を外科的に排除するために前もって当該処置をすることにより外科手術後の転移を防ぐ、そして腫瘍近傍転移リンパ節への転移腫瘍を殺傷し、外科的処理による除去部分を極力小さくするというような、いわゆるネオアジュバントとしての利用可能性を示した点にある。

【0151】

本発明の実施により、わが国で急速に増加しつつある肺癌、乳癌、胃癌・大腸癌・食道癌などの消化器癌、頭頸部癌(上頸癌、舌癌、口唇癌、咽頭癌、喉頭癌、口腔癌など)、婦人科領域の癌(子宮癌、卵巣癌、子宮頸癌など)、泌尿器科領域の癌(前立腺癌)、骨・軟部肉腫、悪性リンパ腫、原発不明癌等すべての固体癌への新たな化学療法が、HVJ-Eベクターを用いることにより可能になる。

【0152】

続いて、本発明による免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有する医薬組成物が有する優れた効果、特にウイルスエンベロープベクターのウイルスエンベロープ糖タンパク質等によるアジュバントによる優れた効果を示すため、具体的実施例を挙げるが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例1

【0153】

(1) 試験デザイン

8週齢のBALB/cAnNCrl系雄マウスの背部皮内に、マウス大腸癌由来のCT-26細胞(5×10^6 細胞)を移植し、担がんマウスを作製した。移植5日後に腫瘍径(長径)が5mm程度に達した動物の腹腔内に0.2mg/bodyのプラトシン注(シスプラチニン、CDDP)を投与した。投与日後に、単回(投与翌日)あるいは複数回(3回:投与1, 5, 8日後)、抗がん剤(塩酸ブレオマイシン：日本化薬)溶液ブレオマイシン[BLM]含/不含HVJ-E等を腫瘍内に投与した。腫瘍径、生存曲線、腫瘍組織における免疫反応について検討した。

さらに担がんマウスに当該処置を施したマウスに、CT-26細胞あるいは同系マウス由来Meth-A細胞を移植し移植細胞の動態を観察した。

【0154】

(試験1.)以下記載の群設定を行い、移植腫瘍における当該処置の抗腫瘍効果について検討した。

モデル設定として、(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与の各群を設定し、それについて21日後の腫瘍容量の測定を行い抗腫瘍効果に及ぼす影響を調べた。

当該群構成および投与用量等について以下に詳細した。

【0155】

| 群 | 被験物質 腹腔内投与 (mg/body)* | 被験物質 腫瘍内投与 (μg/腫瘍)** |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 対照群 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| HVJ-E群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E 0 |
| 6.5 μg BLM/tumor | 生理食塩液 0 | BLM 6.5 |
| 6.5 μg /tumor HVJ-E/BLM群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| 0.2mg/body CDDP群 | CDDP 0.2 | 生理食塩液 0 |
| 0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor | | |
| HVJ-E/BLM群 | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 |

*: シスプラチニ (CDDP) として

**: ブレオマイシン (BLM) として

【0156】

(試験. 2) 試験1においてした場合の当該CDDP HVJ-E/BLM単回投与(単回)処置における抗腫瘍効果の更なる増強を鑑み、HVJ-E/BLMの複数回(3回)投与を行った(試験. 2-1)。さらに当該試験において抗腫瘍免疫により腫瘍の退縮が起こった場合、当該惹起免疫の種類の推定を行うため、腫瘍細胞(CT26細胞(試験. 2-2)およびBALB/cマウス肉腫細胞であるMeth-A細胞(試験. 2-3))の再投与を行い、当該移植細胞の生着、腫瘍用量について調べた。

【0157】

(試験. 2-1)

(1) 対照群、(2) CDDP HVJ-E/BLM単回投与群(単回)、(3) CDDP HVJ-E/BLM3回投与群の21日後の腫瘍容量について検討を行った。

【0158】

| 群 | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 (μg/腫瘍)** |
|------------------------------|---------------------|--------------------|
| 対照群 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| 0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| HVJ-E/BLM投与群 | | |
| 0.2mg/body CDDP-6.5 μg/tumor | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5×3 |
| 3回HVJ-E/BLM投与群 | | |

*: シスプラチニ (CDDP) として

**: ブレオマイシン (BLM) として

【0159】

(試験. 2-2)

細胞の再移植を行なう前までは上記試験と同様の処置を実施し、CDDPの投与15日後に初回腫瘍細胞移植隣接部にCT-26細胞およびMeth-A細胞(5×10^6 個細胞)をそれぞれ皮内に移植し、再移植細胞に拒絶について調べた。

【0160】

| 群 | 再投与細胞 CT-26 | 再投与細胞 MethA |
|---|----------------|----------------|
| | | |

| | | |
|-------------------------------|---|---|
| 対照群1 (初発CT26投与あり) | ○ | ○ |
| 対照群2 (初発CT26投与なし) | ○ | |
| 初発0.2mg/body CDDP-6.5μg/tumor | ○ | |
| HVJ-E/BLM投与群 | | |
| 初発0.2mg/body CDDP-6.5μg/tumor | ○ | ○ |
| 3回HVJ-E/BLM投与群 | | |

【0161】

(試験、3)試験2においてした結果を補足する試験として、直接BLMを腫瘍内に封入量と同等量換算のBLMを投与しその効果についての検討を行った。

| 群 | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 (μg/腫瘍)** |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|
| 0.2mg/body CDDP-6.5μg/tumor | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5×3 |
| 3回VJ-E/BLM投与群 | | |
| 0.2mg/body CDDP-6.5μg/tumor | CDDP 0.2 | 6.5×3 |
| 3回BLMのみ投与 | | |

*:シスプラチニ(CDDP)として

**:ブレオマイシン(BLM)として

【0162】

(試験、4)CTL assay

当該試験においてした抗腫瘍免疫効果か、CT26細胞特異的な抗腫瘍免疫の惹起においてされているかどうかの検討を行うため、動物より回収した脾臓細胞をCT26細胞で刺激し、放射ラベルしたクロムを用いたCTL assayを行い、CT26特異的な抗腫瘍免疫が惹起されているかについて検討した。

係る試験において、(1)CT-26細胞未接種群、(2)CT-26細胞のみ接種群、(3)CT-26細胞接種+CDDP投与群、(4)CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与群をそれぞれ作製し試験に供した。

【0163】

(試験、5)当該抗腫瘍免疫による抗腫瘍効果についての試験においてした腫瘍組織におけるCD-4、CD-8、好中球、マクロファージ等の浸潤を調べるために示す試験群を設定し、CDDP投与9日後の腫瘍組織を摘出し、組織免疫染色を行った。

| 群 | 腹腔内投与 (mg/body)* | 腫瘍内投与 (μg/腫瘍)** |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|
| 対照群 | 生理食塩液 0 | 生理食塩液 0 |
| HVJ-E投与群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E 0 |
| 6.5μg BLM/tumor のみ投与群 | 生理食塩液 0 | BLM 6.5 |
| 6.5μg /tumor HVJ-E/BLM投与群 | 生理食塩液 0 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| 0.2mg/body CDDP投与群 | CDDP 0.2 | 生理食塩液 0 |
| 0.2mg/body CDDP-6.5μg/tumor | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5 |
| HVJ-E/BLM投与群 | | |
| 0.2mg/body CDDP-6.5μg/tumor | CDDP 0.2 | HVJ-E/BLM 6.5×3 |
| 3回HVJ-E/BLM投与群 | | |

【0164】

(2)実験方法

2-1) 腫瘍細胞の培養

BALB/cマウス大腸ガン由来CT-26細胞を、10%FBS含有DMEM培地を用い、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

75cm²のフラスコを用いて細胞培養を行った。約80%コンフルエントに達した後、継代培養を行った。DMEM(10%FBS含有)液を除去後、10mLのリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で細胞を洗浄し、1mLの0.25%トリプシンおよび1mmol/L EDTA-2Na含有PBSを添加し、37℃で細胞を剥離した。9mLのDMEM培地を添加後、細胞を集め、遠心分離(1000rpm、5分間)にて細胞を回収した。上清除去後、10%FBS含有DMEM培地にて細胞を希釈し、培養した。

BALB/cマウスMeth-A細胞は10%FBS含有DMEM培地を用い、37℃、5%CO₂存在下で培養した。

【0165】

2-2) 腫瘍細胞懸濁液の調製

約80%コンフルエントに達した細胞の培養液を除去後、PBSを用いて、培養フラスコを洗浄した。0.25%トリプシンおよび1mmol/L EDTA-2Na含有PBSを少量添加し、37℃で細胞を剥離し始めるまで放置した。DMEM培地を用いて細胞を集め、遠心分離(1000rpm、5分間)した。上清を除去後、PBSに懸濁した。再度遠心分離(1000rpm、5分間)し、上清を除去後、PBSを用いて5×10⁷個/mLに調製した。

【0166】

2-3) マウスの馴化

16日間の検疫馴化期間中、固型飼料および飲水を自由に与えた。

【0167】

2-4) 腫瘍細胞の接種

検疫馴化が終了した動物にバリカンを用いて剃毛を実施した。マウスの背部に、ディスポーザブル注射筒および注射針(26G)を用いて、100μL/site(5×10⁶個/body)を59匹の動物に皮内投与した。投与した翌日に57匹の動物(未投与動物)に同様に投与した。

【0168】

2-5) 動物の群分け

腫瘍の径(長径、短径)を、移植後5日目に測定(群分け後は測定しなかった)した。5日後に腫瘍径(長径)が5mm程度になった動物を、平均腫瘍径(長径)がほぼ均一になるよう、層別無作為化によって群分けした。

【0169】

2-6) 投与

ディスポーザブル注射筒および注射針を用いて、CDDP投与群については1回腹腔内投与(1000μL)した。腫瘍内試料投与群においては、CDDP投与日後に所望試料を腫瘍内に投与(100μL)した。

【0170】

2-7) 腫瘍径の測定

投与日を投与後0日とした。投与後3、6、9、12、15、18および21日に、全例について腫瘍径を計測し、腫瘍体積(長径×短径×短径÷2)を算出した。

CT-26細胞およびMeth-A細胞の再投与においても再投与後の腫瘍径を測定した。

【0171】

2-8) CTL assay

麻酔下の動物より脾臓を取り出し、3mLのRPMI溶液の入った6cm径ペトリディッシュに回収した。滅菌した2枚のスライドガラスのすり部分で脾臓組織をすりつぶし、極力皮膜より脾臓細胞を分離し、残渣はメッシュにより除去した。7mLのPRMI溶液を加えて1200rpm、10分間遠心し上清を除去した。さらに10mLのRPMI溶液を加えて洗浄した。再度洗浄操作を行い、当該操作により得られた細胞を5mLのGIT(10%FCS及び抗生素含有)溶液に懸濁した。該操作で得られた細胞の数を測定した。当該細胞を5×10⁶細胞/mLに調整し、12well plateに2mL/wellとなるように細胞を撒種した。当該wellに刺激細胞としてCT-26細胞を添加した。当該刺激細胞の作製は、1×10⁷細胞/mLに調整した刺激細胞含有GIT溶液に100μLの

マイトマイシンCを添加し1時間、37°Cにて処理した。該処理後9mlのGIT溶液を加え、1000 rpm、5分間遠心し、上清を除去後、10mlのGIT溶液を加えて洗浄操作を行い、当該操作をさらにもう一度行い、最後に1mlのGIT溶液に細胞を懸濁することにより調整した。当該細胞を細胞密度がGIT溶液を添加することにより、 2.5×10^5 細胞/mlになるように調整し、前述の脾臓組織より回収した細胞懸濁液中に該溶液2mlを添加した。

刺激細胞なし試料ではGIT溶液のみを2mlを添加した。当該試料を6日間培養した。CTL assayにおいては当該細胞をターゲットとして使用した。

該組織より回収した脾臓細胞の培養試料を用いてCTL assayを行った。まずターゲット細胞として使用するCT-26細胞の調整を以下のように行った。CT-26細胞を 1×10^7 細胞/ml (GIT培地中)となるよう調整し $150 \mu l$ を取り、該溶液に1mCi/mlの放射ラベルしたCr溶液 $150 \mu l$ を加え、1時間37°Cにて培養した。10mlのGIT溶液を加えて細胞を洗浄し、1000 rpm、5分間遠心し細胞を回収した。上清を除去し10mlのGIT溶液を加えて洗浄した。都合3回同操作を行い洗浄を行った。当該操作により得られた細胞を $150 \mu l$ のGIT溶液に懸濁し、最後に100倍希釈し 1×10^5 細胞/mlとなるよう調整し、ターゲット細胞(T)として以下の操作に用いた。

エフェクター細胞(E)は方法の部分で示した4群からの処理した細胞を回収し、調整し用いた。

実際のCTL assayは、エフェクター細胞(E)とターゲット細胞(T)との比、E/T比がそれぞれ80、40、20、10、5にし測定を行った。この際、ターゲット細胞は $100 \mu l$ (1×10^5 細胞/ml)を加え、全量が $200 \mu l$ とした。当該試料を4時間37°Cで処理した。

培養終了後、遠心により細胞および残渣を除去し、 $100 \mu l$ を回収し、 γ -カウンターに入れ計測した。以下の式により% specific Cr releaseを算出した。

$$\% \text{ specific Cr release} = b - c / (a - c) * 100 \text{ (%)}$$

a: maximum release (cpm)

b: experimental release (cpm)

c: spontaneous release (cpm)

【0172】

2-9) 当該腫瘍組織は腫瘍組織染色を行うために液体窒素中で凍結した。腫瘍組織をクライオスタッフで $8 \mu m$ 厚切片を作製した。組織切片を-20°Cの冷アセトン中で15分間固定した。水洗後内因性アビシン・ビオチンのプロッキングを行い水洗した。試料を正常ウサギ血清により反応を行い、50倍希釈した一次抗体(抗マウスCD8a・ラット抗体(Ly-Z; Pharmingen)、抗マウスCD4a・ラット抗体(L3T4; Pharmingen))と4°C、一晩反応させた。7.5mMトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄後、300倍希釈した抗ラット・ビオチン標識ウサギIg(DAKO)と30分間反応させた。9.5mMトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄後、100倍希釈のストレプトアビシンと30分間反応させた。11.5mMトリス緩衝液(pH7.5)で洗浄後、ファーストレッドにより発色させた。水洗後ヘマトキシリンで核染色を行った。

【0173】

結果

試験1の結果)

(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群の腫瘍容量を測定した。

試験は各群合計10匹とし5匹づつ2回に分けて試験を行った。当該試験において特筆すべきことは(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群において了当該試験動物10匹のうち2匹のマウスにおいて外見上移植した腫瘍細胞が消え、観察したことである。2回試験した内1の試験において了5匹の動物の腫瘍容量の平均値をグラフに示した。それぞれの平均腫瘍容量は、(1)対照群: 1641 mm^3 、(2)HVJ-E群: 1386 mm^3 、(3)BLMのみ群: 1303 mm^3 、(4)HVJ-E/BLM群: 718 mm^3 、(5)CDDPのみ群: 387 mm^3 、(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群: 51 mm^3 となった。対照群の平均腫瘍容量を100%とし、各群の平均値を比較すると、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群はそれぞれ、82.9%、80.0%、43.0%、23.2%、3.1%となった(図18)。

【0174】

試験2-1の結果

(1) 対照群、(2) CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群、(3) CDDP+HVJ-E/BLM3回投与群 (CDDP投与後のHVJ-E/BLM投与日、1, 5, 8日後) モデルを作製し、当該(2) CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群と(3) CDDP+HVJ-E/BLM3回投与群における腫瘍拒絶について効果を調べた。

まず図に示すように、(2)群で4匹中1匹のマウスで寛解が認められた。(3)群では5匹中4匹で寛解が認められた。(図19)

【0175】

試験2-2および2-3の結果

試験2-2でした同系腫瘍細胞 (CT-26細胞) 再投与試験において、CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群で4匹中1匹のマウスで寛解し、当該マウスにおいてCT-26細胞の再接種動物は移植細胞を拒絶した。しかし、残りの3匹において初発腫瘍細胞は拒絶されておらず、当該動物にCT-26細胞を移植した動物ではCT-26細胞の再移植後に該細胞を拒絶することはできなかった。一方CDDP+HVJ-E/BLM3回投与群では5匹中4匹で拒絶が認められた。以上の結果より、腫瘍免疫が惹起されていることが確認された(図20)。当該腫瘍免疫がCT-26細胞特異的であるかについては次試験により判定した。

試験2-3 でした試験においてはCDDP+HVJ-E/BLM3回投与により寛解したマウスに移植したMeth-A細胞を拒絶することはできなかった(図21)。

【0176】

試験3の結果

今までにした試験において当該CDDP+HVJ-E/BLMにおいて抗腫瘍効果が認められた。しかし、この際のBLMの効果について、HVJ-Eの有無、すなわちBLMのHVJ-Eへ封入の効果 (HVJのアジュバント効果も含めて) が検討をしておらず、今回CDDP併用時における当該効果について検討した。その結果を図22に示した。図から明らかなように、BLMをHVJ-Eに未封入の場合において試験では当該処理において腫瘍の退縮効果はBLMをHVJ-Eに封入した場合に比べて全く上がらず、腫瘍を退縮させることはできなかった。CDDP併用時においてBLMを腫瘍組織直接導入する際にも、BLMをHVJ-Eに封入し腫瘍組織に導入しなければ腫瘍を退縮させる効果が認められないことが判明した。

【0177】

試験4の結果

試験1および2においてした試験結果において、CDDPの全身投与とBLMをHVJ-Eに封入し腫瘍組織に直接投与することにより、以下の点が明らかになった。

- ・腫瘍組織を退縮させることができること
- ・その効果はBLMをHVJ-Eに封入した試料を複数回投与して効果があがること
- ・当該処理において移植細胞を退縮した寛解したマウスに同細胞を再移植した動物では当該細胞を拒絶したこと
- ・しかし、当該寛解マウスに同系異種細胞を移植した場合には拒絶することができなかったこと

【0178】

よって当該試験において移植細胞に特異的な免疫が誘導されることが推定されたが、さらに直接的な特異的免疫の誘導を調べるためにCT-26細胞に特異的な免疫が誘導されているかどうかについて検討した。

(1) CT-26細胞未接種群、(2) CT-26細胞のみ接種群、(3) CT-26細胞接種+CDDP投与群、(4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与群を設定、CTL assayを行いCT-26細胞に特異的なCTLについて検討した。エフェクター細胞 (E) とターゲット細胞 (T) との比、E/T比を変化させ、% specific Cr release によりCTLの誘導を調べた。結果図23よりET比を80としたとき、(1) CT-26細胞未接種群: 8.1%、(2) CT-26細胞のみ接種群: 8.1%、(3) CT-26細胞接種+CDDP投与群: 12.9%、(4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与群: 33.5%となった。

以上の結果より (4) CT-26細胞接種+CDDP+HVJ-E/BLM 3回投与においてCT-26細胞に特異

的なCTLの誘導が起こっていることが判明した。

【0179】

試験5の結果

(1)対照群、(2)HVJ-E群、(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群、(5)CDDPのみ群、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群、(7)CDDP、HVJ-E/BLM3回投与群を設定し、CDDP投与9日後の当該動物より腫瘍組織を採取し、当該組織の切片をそれぞれ作製した。まず、HE染色(図24, 25)および抗CD-4抗体および抗CD-8抗体特異的免疫組織染色(データは示さず)より当該組織において認められる特徴的な病理所見を記載する。(1)対照群においては核分裂を呈している細胞が多く、また核密度が高いという腫瘍細胞に特徴的な悪性細胞所見が認められた。腫瘍組織の中心部ではネクロティックな細胞死が認められた。大半がsarcoma細胞特有の形態、つまりCT-26細胞の旺盛な増殖像が認められた。CD-4およびCD-8(図26, 27)陽性像はほとんど見られなかった。(2)HVJ-E群においても総体的に(1)対照群とほぼ同じであり、HVJ-Eを投与した針跡近傍で好中球の浸潤が認められた。(3)BLMのみ群、(4)HVJ-E/BLM群においても、ほぼ同様の所見であった。

【0180】

前者に比べて(5)CDDPのみ群では、腫瘍組織の広範にわたって腫瘍細胞の壊死像が認められた。これは腹腔内投与したCDDPが血管等を通じて腫瘍組織に広かり、CDDPの抗がん剤としての効果により腫瘍細胞を排除していると考えられた。しかし、CDDPのみの投与ではまだ腫瘍細胞を壊滅させることはできず、腫瘍細胞が残存が認められ、当該細胞により日後の腫瘍増殖が認められたものと推察された。(6)CDDP HVJ-E/BLM単回投与群では、総体的に腫瘍細胞が少なくなり、かなりの腫瘍細胞は消滅している。本試料の回収日はCDDP投与9日目であり、まだ寛解状態に至っておらず、本試料が寛解できうるかどうかは不明である。ただ、CD-4およびCD-8陽性細胞数(図26, 27)は増加しているが、後述のHVJ-E/BLMの連続投与に比べると少ない。(7)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群では、腫瘍細胞はほとんど認められず、抗原線維が変性壊死を起こし液状状態の部位が認められた。総体的に細胞数が少なく、広範に好中球の浸潤が認められた。特徴的なことは、他組織ではそれほど認められることのなかった、抗CD-4抗体および抗CD-8抗体陽性細胞(図26, 27)が広範に認められたことが特徴として挙げられる。腫瘍組織に浸潤する抗CD-8抗体に対する陽性細胞のほとんどはCTL細胞であることが報告されており、(7)CDDP HVJ-E/BLM3回投与群で、腫瘍の寛解は試験懸4の結果とあわせてCTLによるものであると予想された。

【0181】

本実施例では(1)樹状細胞によるワクチン効果がCpG-ODNを添加することにより上昇した点、と(2)HVJ-E/BLMの腫瘍内投与とCDDPの全身投与の相乗効果により抗腫瘍免疫が惹起されたことが示された。

また本発明の特徴として、以下を挙げることができる。

- ・腫瘍の寛解が認められた。
- ・寛解の理由の一つとして、CD-8陽性細胞の腫瘍組織への浸潤、つまり腫瘍細胞特異的なCTLによる効果が考えられる。
- ・HVJ-E/BLMあるいはCDDP単独投与のみでは効率のよい腫瘍免疫が惹起できないことから併用が重要である。
- ・CDDP投与でCDDPの効果は弱いながらも腫瘍組織全体に行き渡り、その後のHVJ-E/BLM投与により、CDDPにより脆弱となった腫瘍組織にHVJ-E/BLMが効率よく送達されその効果を発揮した。
- ・その際、HVJ-Eは腫瘍免疫を惹起するアンジュバンドとして作用する。

【0182】

免疫染色図の説明

図13HE染色図に対する説明

ControlではCT-26がん細胞の、核密度が高い、hyper chromatin、核の大きさの不揃い、核分裂が多い等の悪性所見像が認められる。この現象はHVJ-E、BLM、HVJ-E/BLM投与時にも多少の差はあれ同様の所見が認められた。壊死部分での好中球、マクロファージの浸

潤像が認められた。CDDP投与の試料では空胞変性が認められ好中球、マクロファージ等が癌細胞中に浸潤しており、係る細胞が癌細胞を取り囲んでいる様子が見受けられる。CDDP+HVJ-E/BLMの単回投与では、腫瘍細胞数が少なくなり、リンパ系細胞が多く認められる。HE染色の濃さが薄くなり、よりピンクな像となっている。これは細胞中の核酸濃度が低下している証拠であり、がん細胞の細胞密度が低下していることによるものであると考えられる。CDDP+HVJ-E/BLMの3回投与では、ほとんどが癌細胞が認められず、あっても分裂像は少なく増殖性を失っている。変性壊死している部分が多く炎症性細胞の浸潤も広範囲に認められ、リンパ球系細胞も多く認められた。

【0183】

図14および図15の図に対する説明

腫瘍免疫による抗腫瘍効果の一つとしてCTLが考えられる。よって、腫瘍内にCTL細胞が実際に浸潤しているかどうかについて、CD8細胞（腫瘍組織に浸潤するCD8陽性細胞はそのほとんどがCTL細胞であることが報告されている）浸潤について検討を行った。

Control、HVJ-E、BLM、HVJ-E/BLM投与ではCD8陽性の細胞は散在性に認められるが、数としてはそれほど多くない。CDDP投与では陽性数が増加し広範囲におよんである。CDDP+HVJ-E/BLMの単回投与ではCD8陽性数がさらに増え陽性染色の強度が高まっていた。

CDDP+HVJ-E/BLMの3回投与では、他と明らかに異なり、CD8陽性細胞はびまん性に存在し染色性も非常に高かった。よって、CT26細胞特異的なCTLの誘導によりCT26腫瘍細胞が壊死していることが判明した。

これらの知見により、CDDP+HVJ-E/BLMの繰り返し投与により抗腫瘍免疫が惹起され、challengeによる腫瘍の拒絶も、本作用に基づくと考えられた。

【図面の簡単な説明】

【0184】

【図1】*in vitro*実験における、各群の生細胞数を比較したグラフである（平均土標準偏差で示す）。

【図2】*in vivo*実験における、各群の平均腫瘍容量を比較したグラフである（平均土標準偏差で示す）。

【図3】*in vivo*実験における、投与16日後の各群の平均腫瘍容量の変化率、およびメデューム(PBS)群に対する変化率を示したグラフである（平均土標準偏差で示す）。

【図4 A】融合細胞の細胞分布を示す。左上の2つのパネルのうち、FL2(左上のパネルの左側)は、CD11c陽性(樹状細胞)を示し、FL1(左上のパネルの右側)は、gp100陽性(メラノーマ細胞=BL6)を示す。示されるようにほとんどが、それぞれのマーカー陽性であることが確認される。その後、HVJ 500HAUで融合すると、右上のパネルに示すように、融合が起こる。このうち、URが融合の起こった細胞であって、双方の性質を保持する理想的な細胞を示す。このように20%を越える効率の細胞融合が生じた。右下には、UL、URおよびLRにおける染色の様子を示す。二重に染色されるURは、真ん中に示されるようにほぼ均一に染色される。

【図4 B】HAUの値を0~1000まで変動させたときの結果を示す。右から1000HAU、500HAU、100HAUおよび0HAU(単なる混合物)を示す。下のFACSのパネル右上には、融合細胞の割合を示す。

【図4 C】樹状細胞、メラノーマ細胞および融合細胞における二重染色の比較を示す。

【図5 A】TNF α の分泌を示す。mixは単なる混合物を示し、FCは融合細胞を示し、mix+CpGは混合物にアジュバントCpGを加えたものを示し、FC+CpGは融合細胞にアジュバントCpGを加えたものを示し、FCNonCpGは融合細胞にアジュバントでない非CpGオリゴヌクレオチドを加えたものを示す。示されるように、融合細胞の添加およびCpGの添加により、有意にTNF α の分泌が促進された。

【図5 B】IL-12p40の分泌を示す。示されるように、融合細胞の添加およびCpGの添加により、有意にIL-12p40の分泌が促進された。

【図6 A】インターフェロン γ の分泌を示す。示されるように、融合細胞の添加およ

びCpGの添加により、有意にインターフェロン γ の分泌が促進された。

【図6 B C】左図は ^{51}Cr 非放出のE/T(エフェクター細胞/標的細胞)比を示す(B16細胞)。PBSはコントロールを示し、CpGはCpGのみを示し、mixは混合物を示し、FCは融合細胞を示し、mix+CpGは混合物にアジュバントCpGを加えたものを示し、FC+CpGは融合細胞にCpGを加えたものを示す。右図は ^{51}Cr 非放出のE/T(エフェクター細胞/標的細胞)比を示す(EL細胞)。

【図7 A】腫瘍体積の推移を示す。B16細胞の接種後の体積の推移である。PBSはコントロールを示し、CpGはCpGのみを示し、mixは混合物を示し、FCは融合細胞を示し、mix+CpGは混合物にアジュバントCpGを加えたものを示し、FC+CpGは融合細胞にアジュバントCpGを加えたものを示す。

【図7 B C】左図はB16細胞接種後の生存率を示す。融合細胞およびそれにCpGを加えた群では、有意に生存率が改善した。右図は腫瘍のないマウスの割合の推移(B16細胞接種後の生存率)を示す。PBSはコントロールを示し、CpGはCpGのみを示し、mixは混合物を示し、FCは融合細胞を示し、mix+CpGは混合物にアジュバントCpGを加えたものを示し、FC+CpGは融合細胞にアジュバントCpGを加えたものを示す。融合細胞およびそれにCpGを加えた群では、有意に生存率が改善した。

【図8 A】インターフェロン γ の分泌を示す。融合細胞の添加およびCpGの添加により、有意にインターフェロン γ の分泌が促進された。

【図8 B C】左図は ^{51}Cr 非放出のE/T(エフェクター細胞/標的細胞)比を示す(RENCA細胞)。右図は ^{51}Cr 非放出のE/T(エフェクター細胞/標的細胞)比を示す(CT26細胞)。

【図8 D】腫瘍のないマウスの割合の推移(RENCA細胞接種後の生存率)を示す。腫瘍マーカーの不明なRENCA細胞であっても、融合細胞およびCpGの併用群(融合細胞および混合細胞)では、有意に生存率が改善した。

【図9】肺転移からの保護率を示す。肺転移からの保護効果においても融合細胞の効果が観察され、融合細胞とCpGとの組み合わせが最も効果的であった。各点は個々の固体を示し、バーは平均を示す。

【図10】各群の腫瘍容量を比較したグラフである。

【図11】同系腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。

【図12】各群におけるCD-4陽性像を比較したグラフである。

【図13】各群におけるCD-8陽性像を比較したグラフである。

【図14】(1)対照群[右上]、(2)HVJ-E群[右下]、(3)BLMのみ群[左上]、(4)HVJ-E/BLM群[左下]における、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色図である。

【図15】(5)CDDPのみ群[右上]、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群[右下]、(7)CDDP+HVJ-E/BLM連続投与群[左上]における、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色図である。

【図16】(1)対照群[右上]、(2)HVJ-E群[右下]、(3)BLMのみ群[左上]、(4)HVJ-E/BLM群[左下]における、CD8陽性染色図である。

【図17】(5)CDDPのみ群[右上]、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群[右下]、(7)CDDP+HVJ-E/BLM連続投与群[左上]における、CD8陽性染色図である。

【図18】各群の腫瘍容量を比較したグラフである。

【図19】CDDPとHVJ-E/BLMの単回および複数回投与の抗腫瘍効果を比較したグラフである。

【図20】同系腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。再投与は15日に行ったものである。

【図21】同系異腫瘍細胞再投与試験で、腫瘍免疫惹起効果を比較したグラフである。再投与は0日に行ったものである。

【図22】CDDPとBLMをHVJ-Eへの封入有無についてした場合の抗腫瘍効果を比較したグラフである。

【図23】CTL assayによるCTLの誘導をみたグラフである。

【図24】各腫瘍組織切片のHE染色図である。(1)対照群[右上]、(2)HVJ-E群[右下]、(3)BLMのみ群[左上]、(4)HVJ-E/BLM群[左下]における、ヘマトキシリン・エオジ

ン(HE)染色図である。

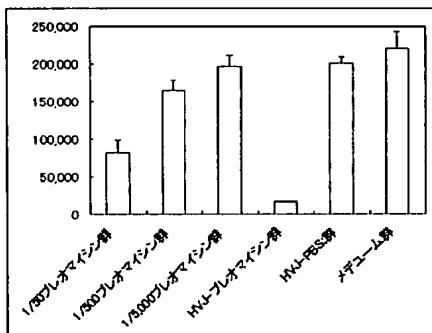
【図25】(5)CDDPのみ群【右上】、(6)CDDP+HVJ-E/BLM単回投与群【右下】、(7)CDDP+HVJ-E/BLM連続投与群【左上】における、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色図である。

【図26】各群におけるCD-4陽性像を比較したグラフである。

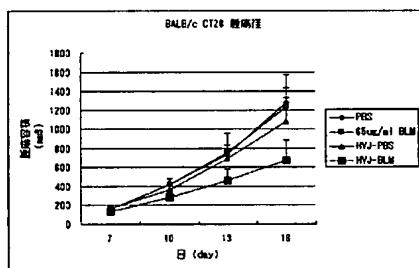
【図27】各群におけるCD-8陽性像を比較したグラフである。

【書類名】図面

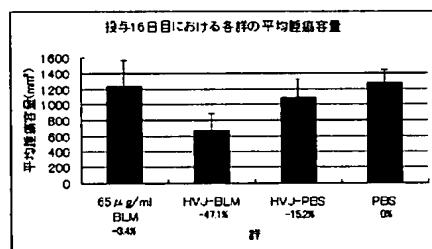
【図 1】



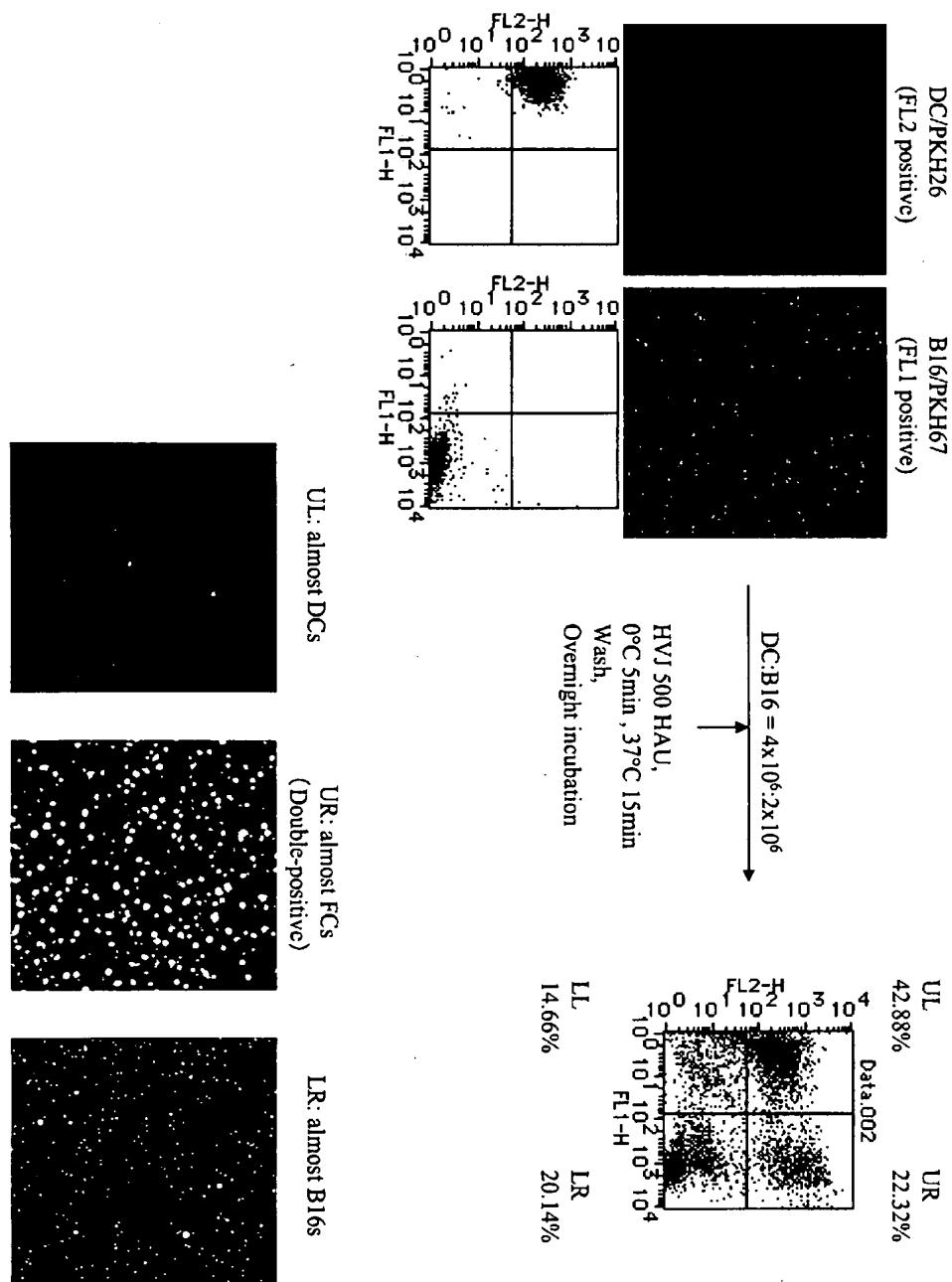
【図 2】



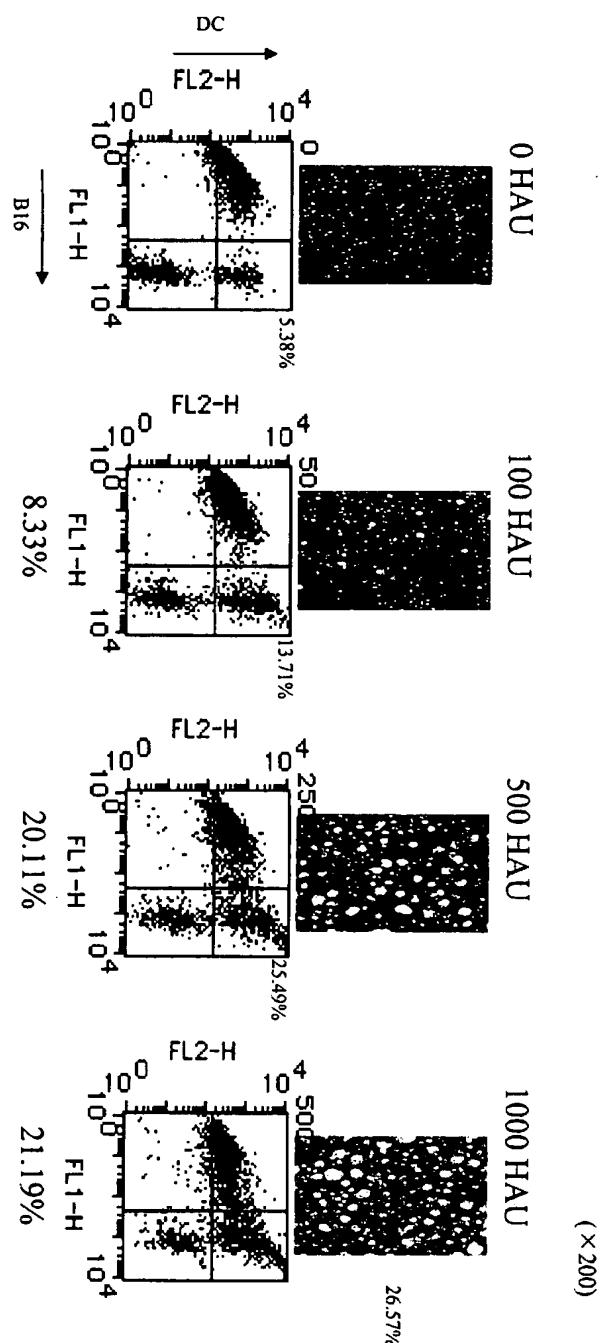
【図 3】



【図 4 A】



【図 4 B】

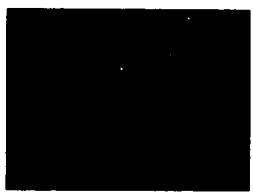


【図4 C】

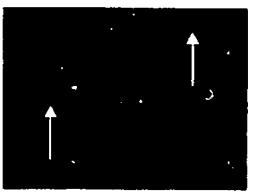
DC/FITC-CD11c



B16/PE-gp100

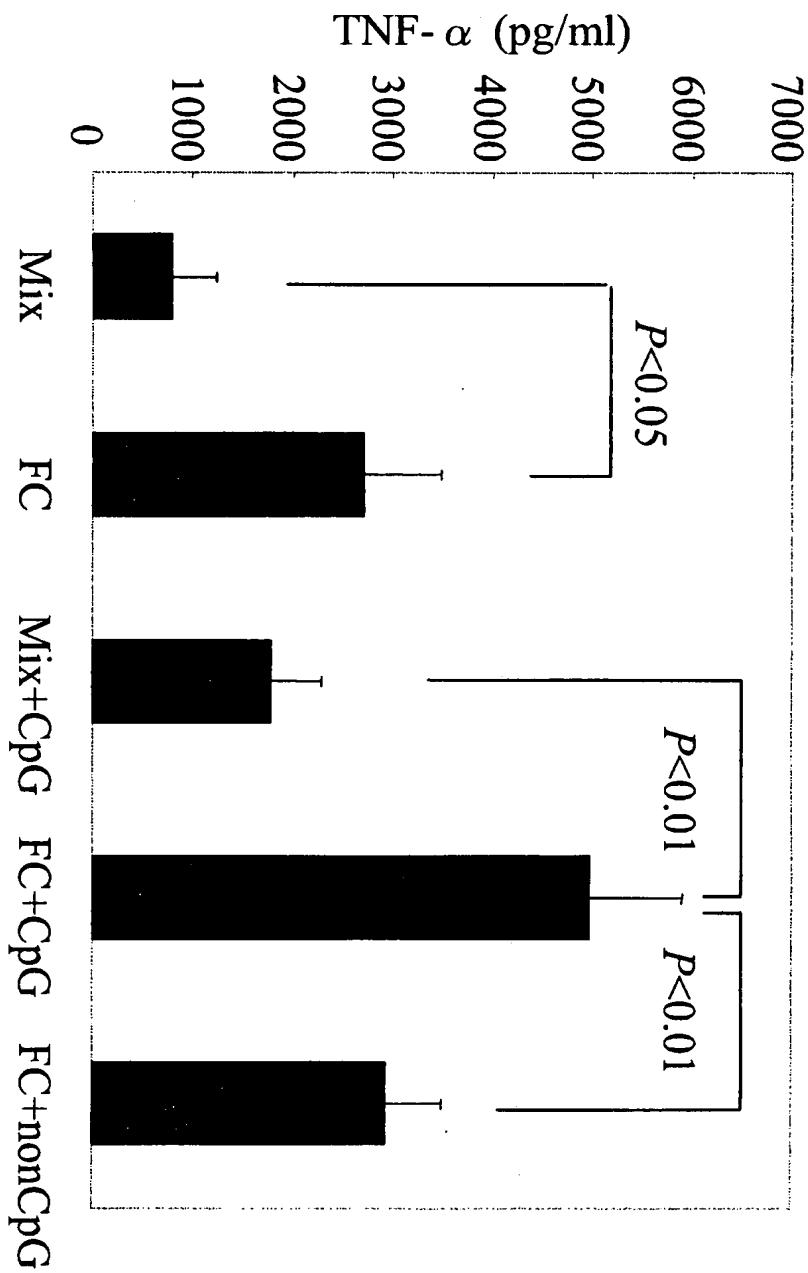


Fusion Cell

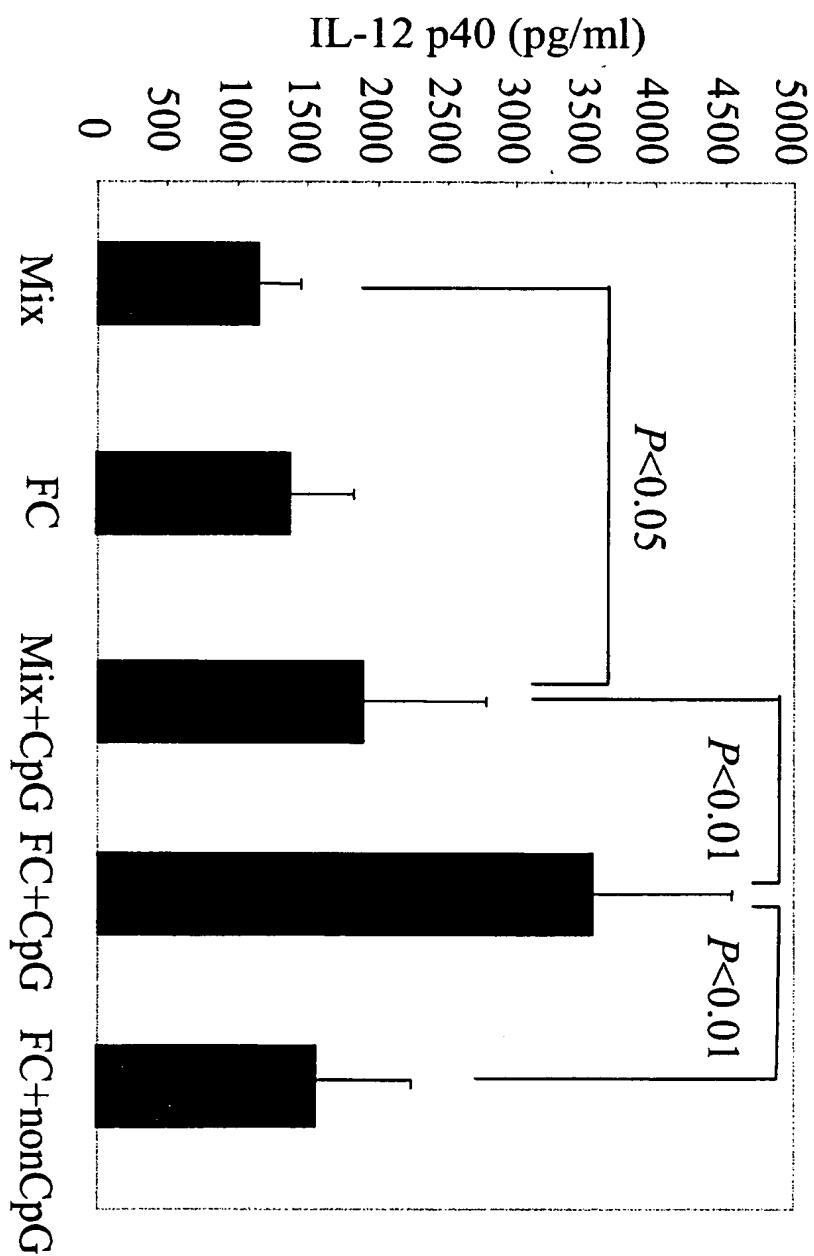


(×400)

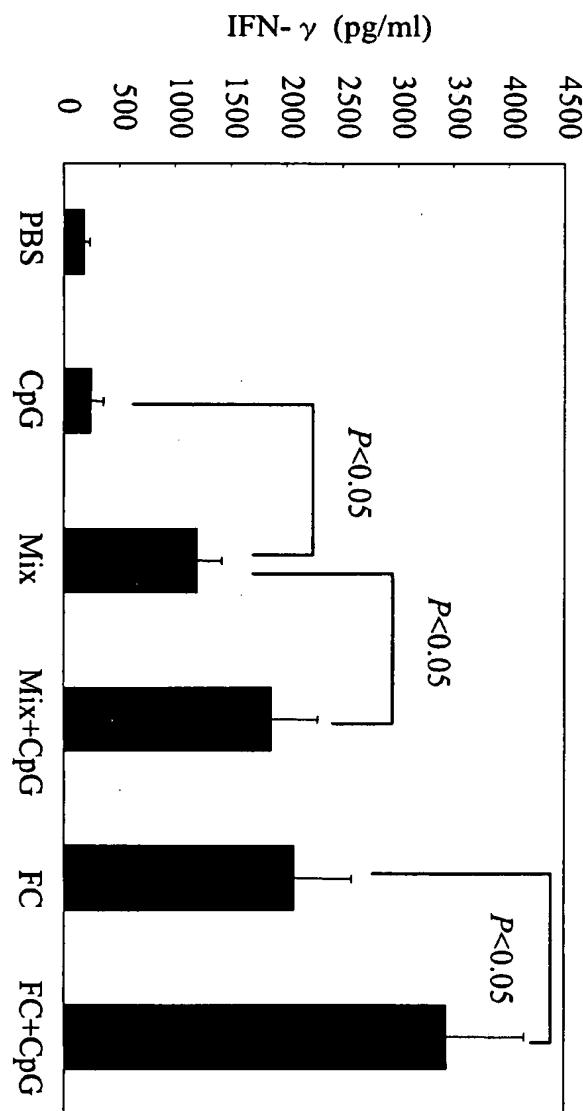
【図 5 A】



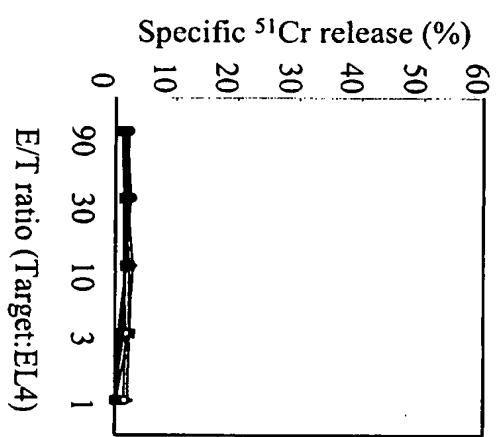
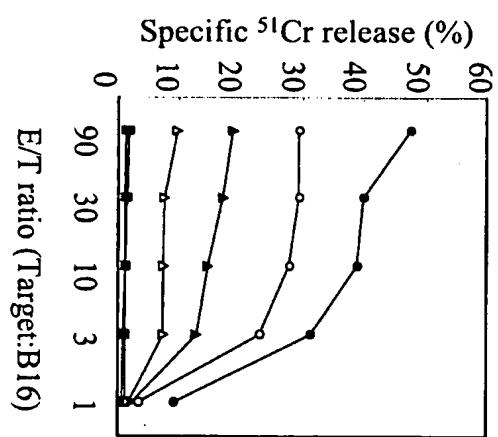
【図 5 B】



【図 6 A】



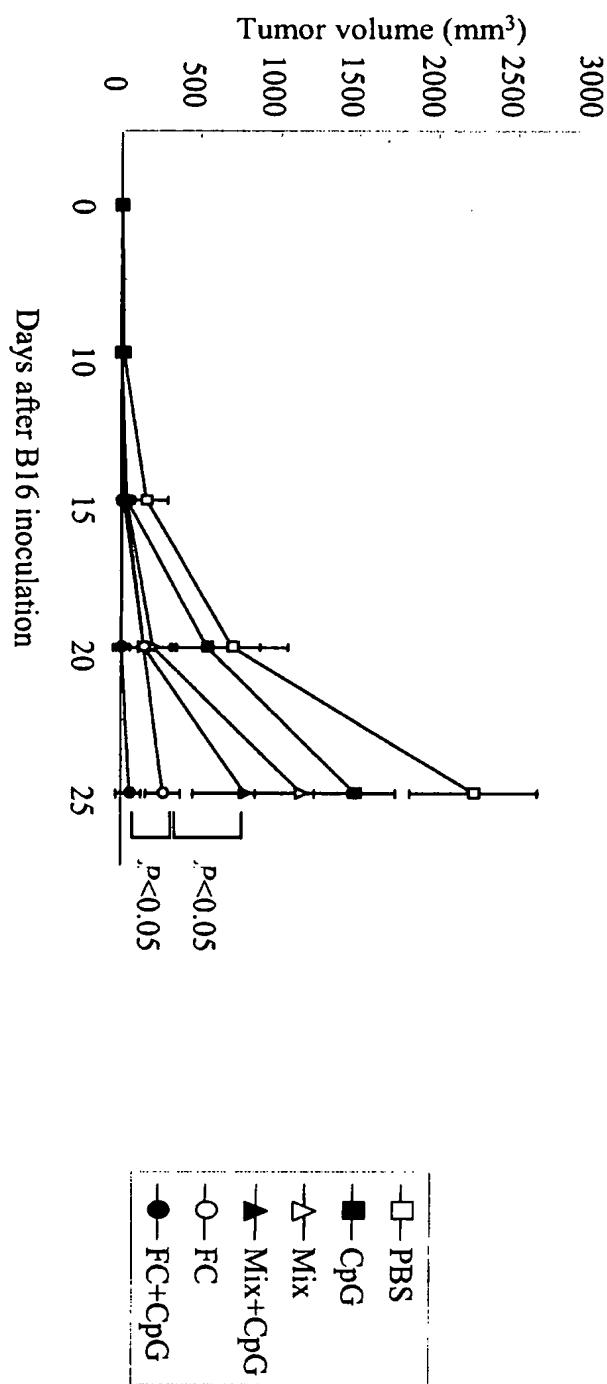
【図 6 B C】



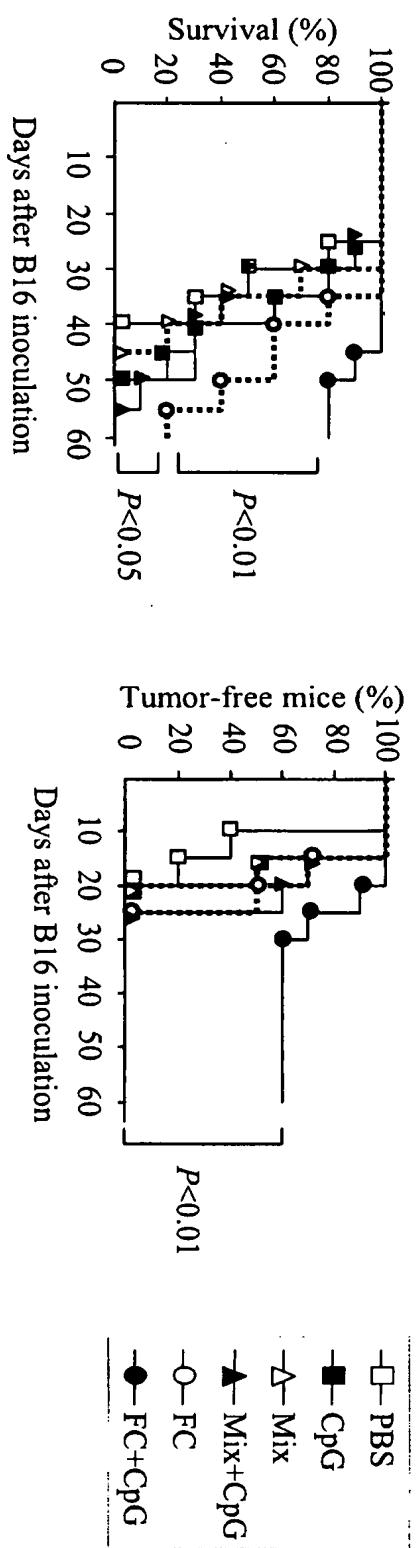
Legend:

- PBS
- CpG
- △ Mix
- ▲ Mix+CpG
- FC
- FC+CpG

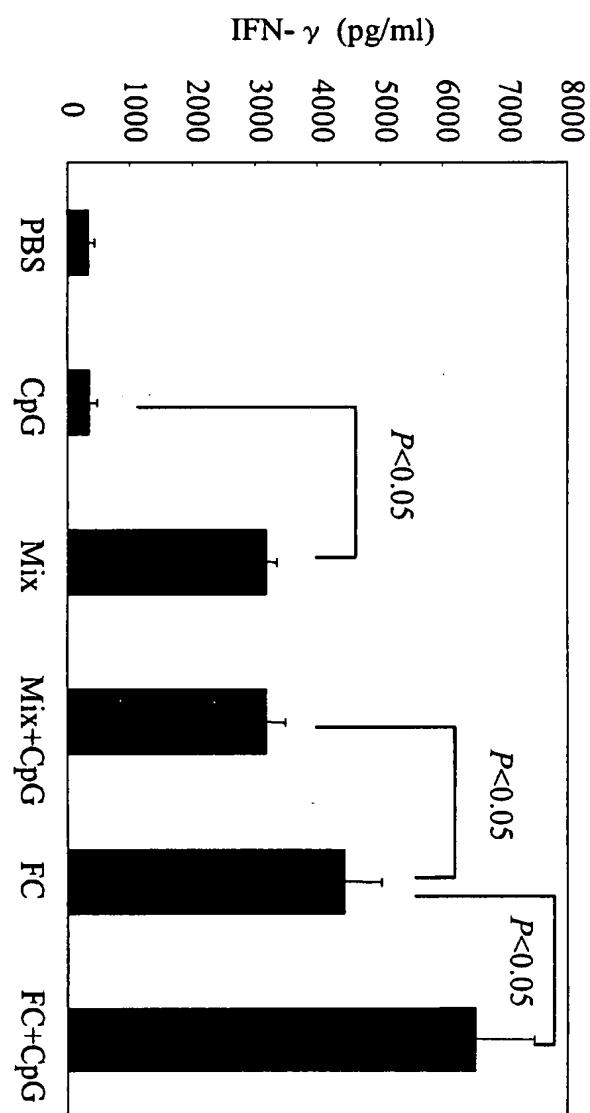
【図 7 A】



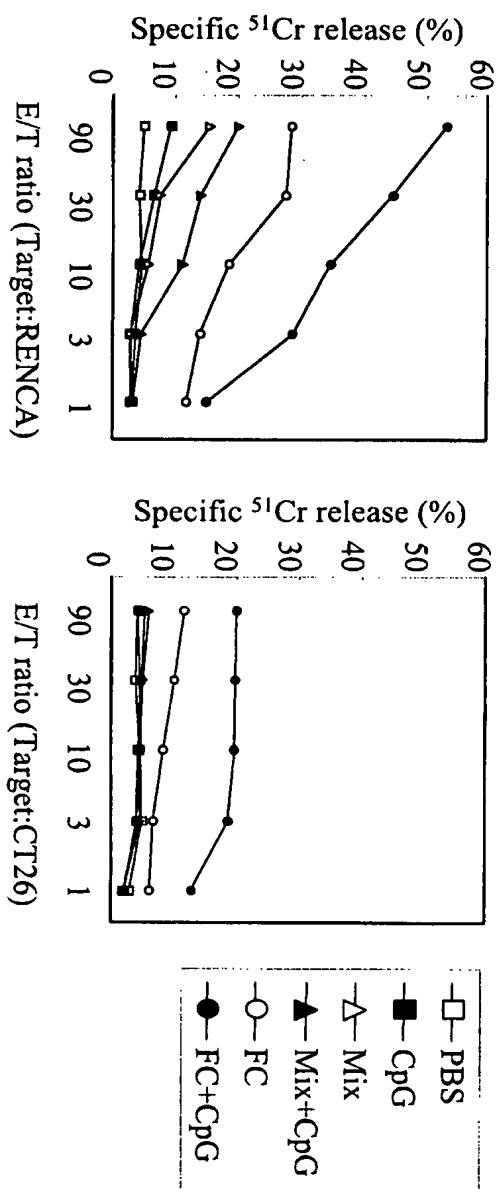
【図 7 B C】



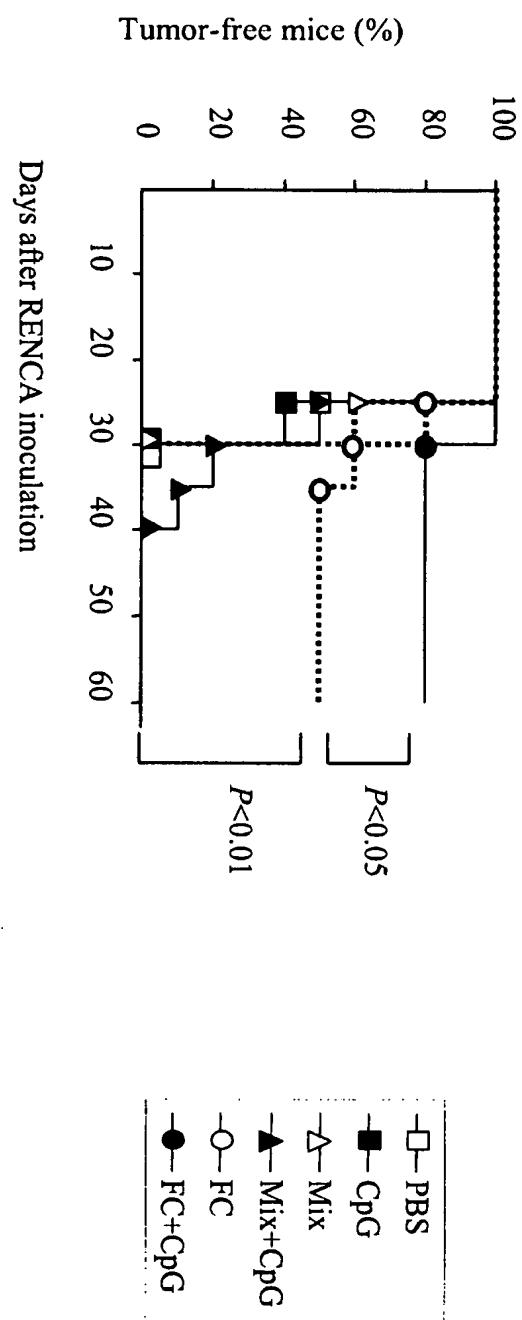
【図 8 A】



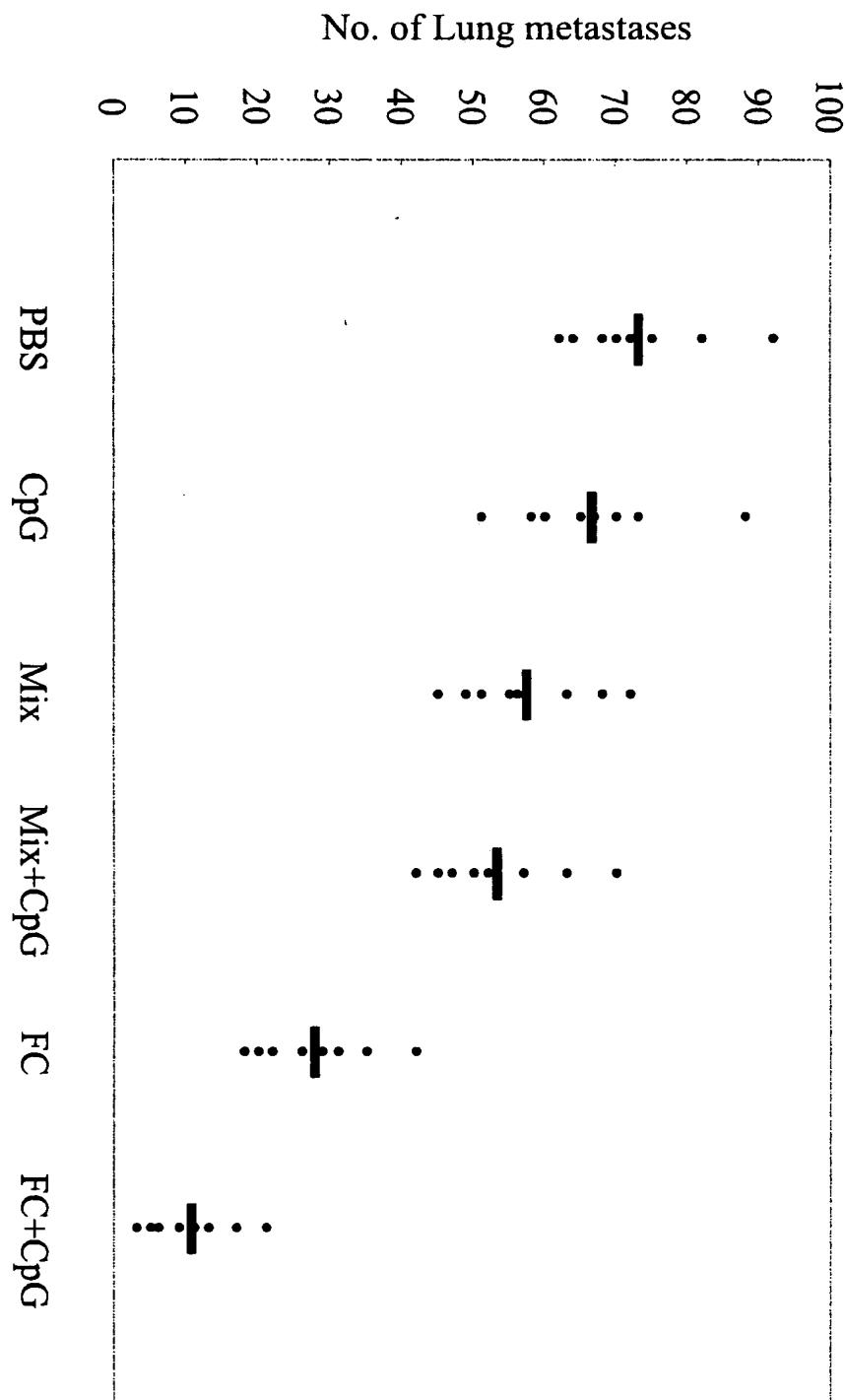
【図 8 B C】



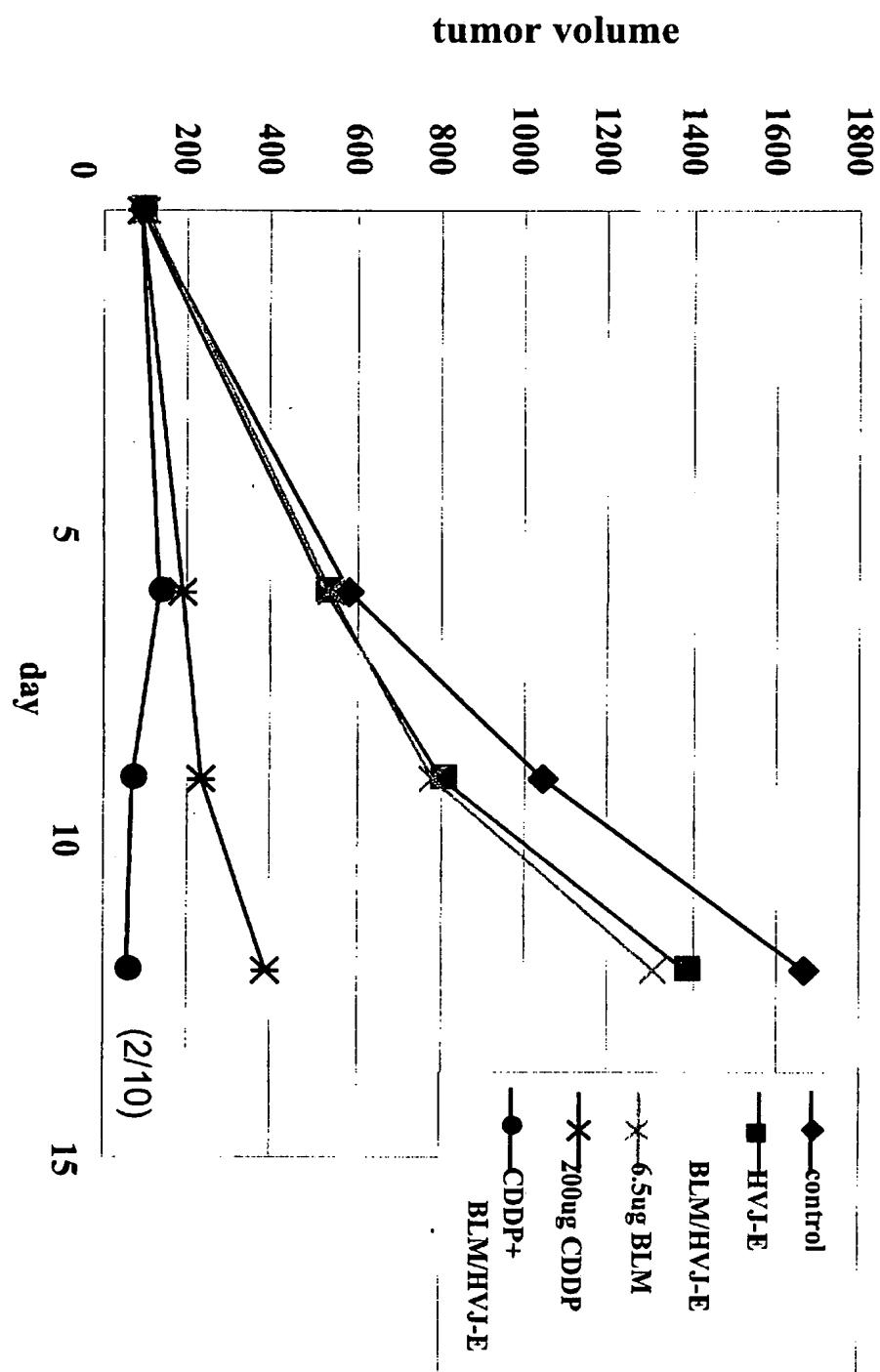
【図 8 D】



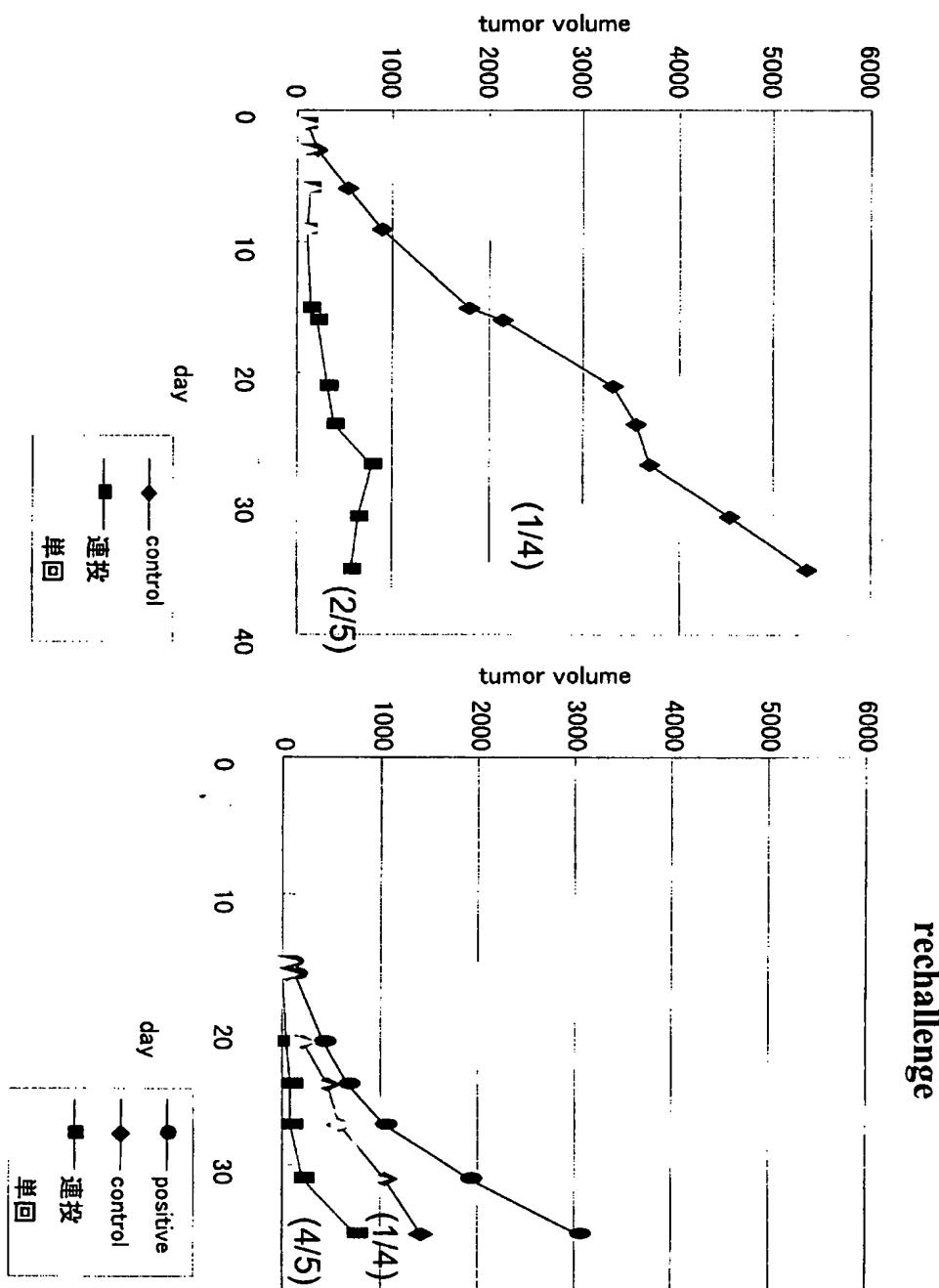
【図9】



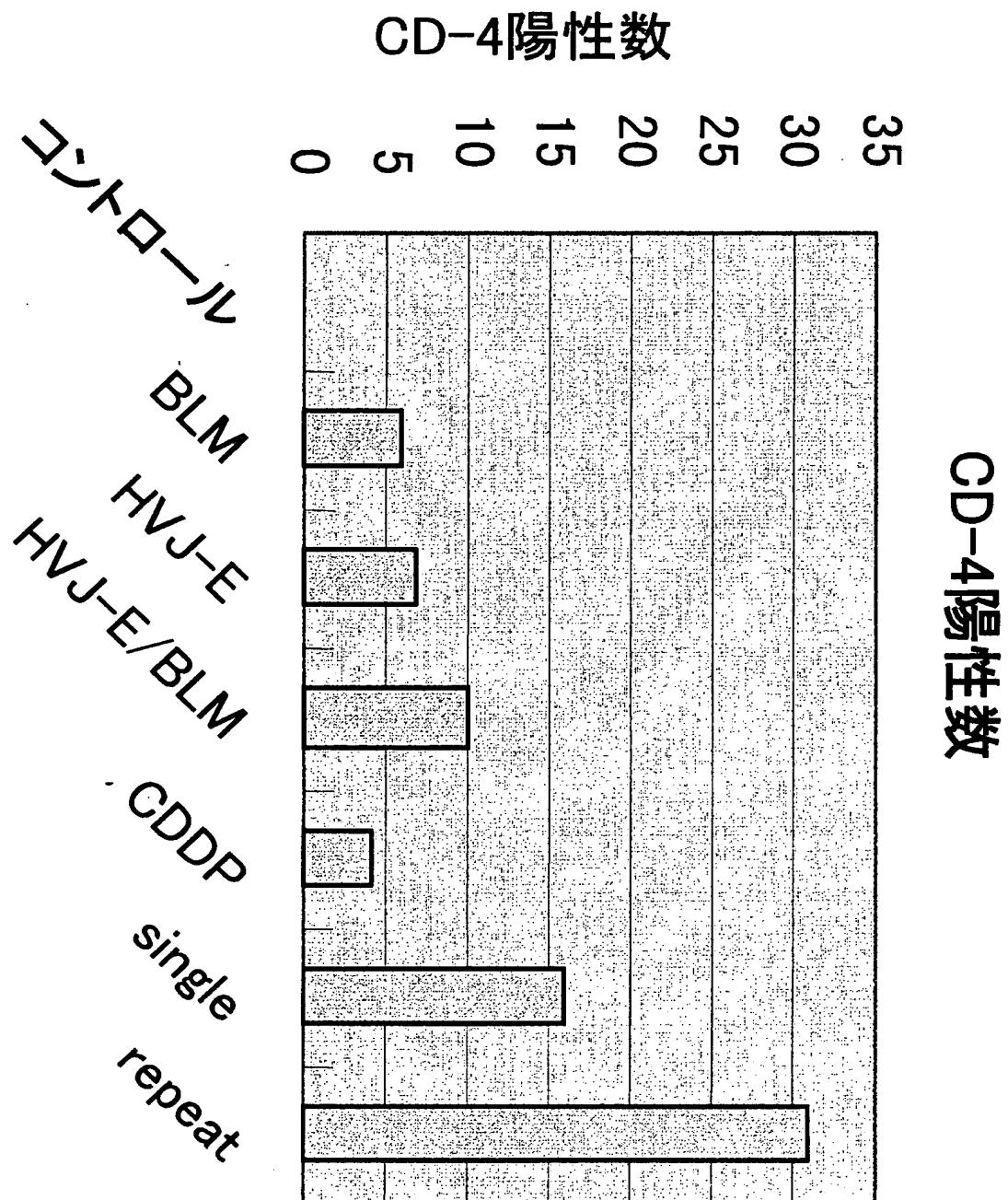
【図 10】



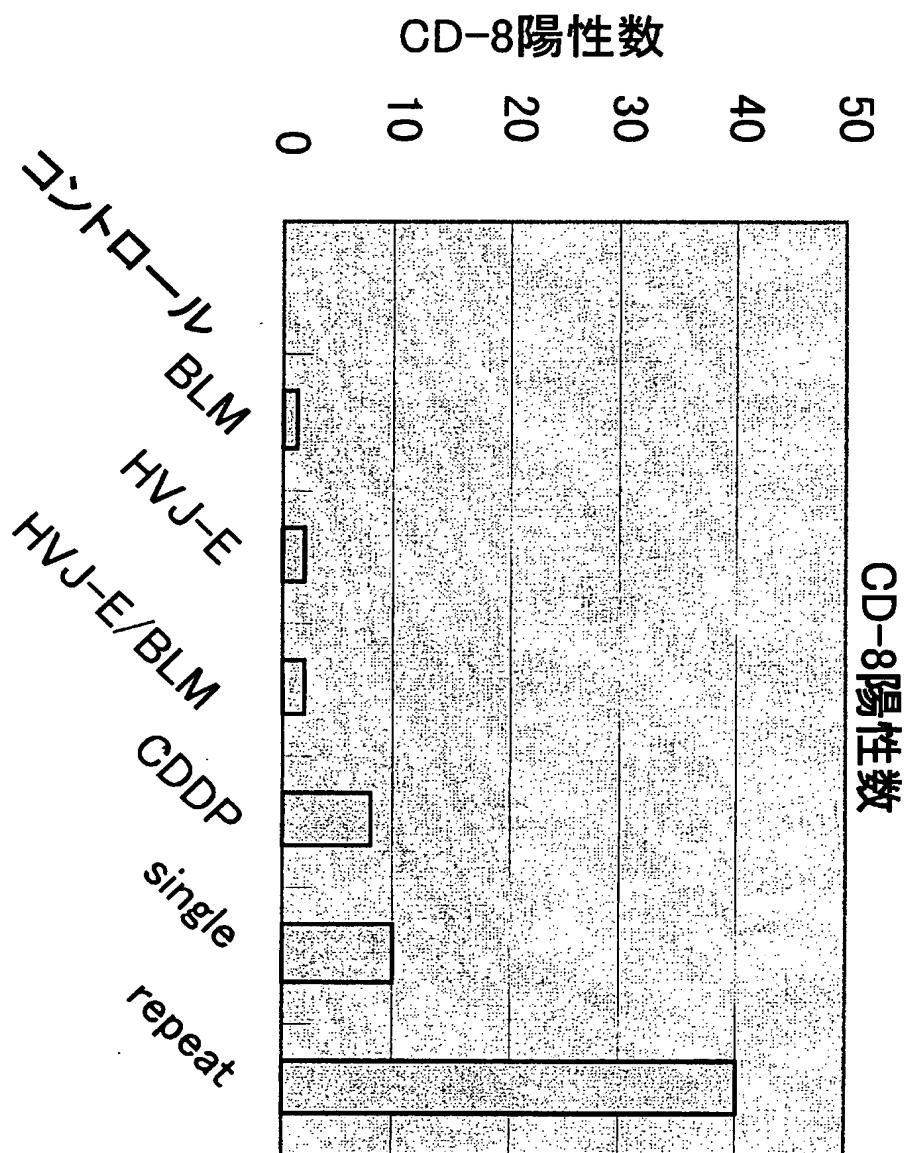
【図 1-1】



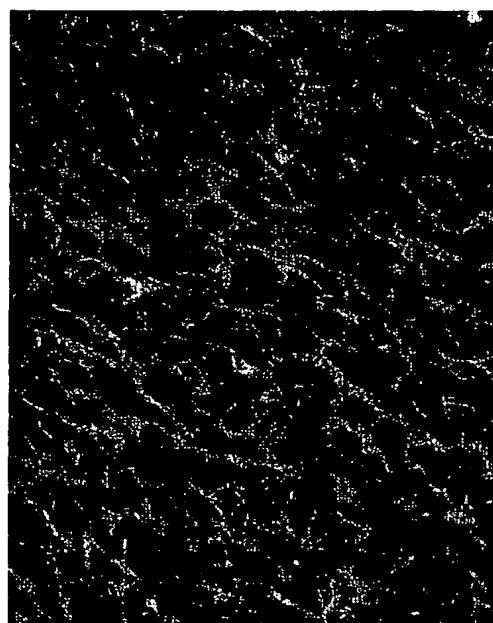
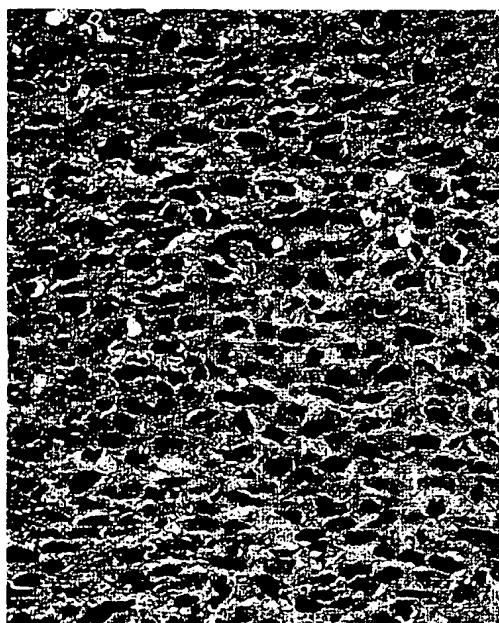
【図12】



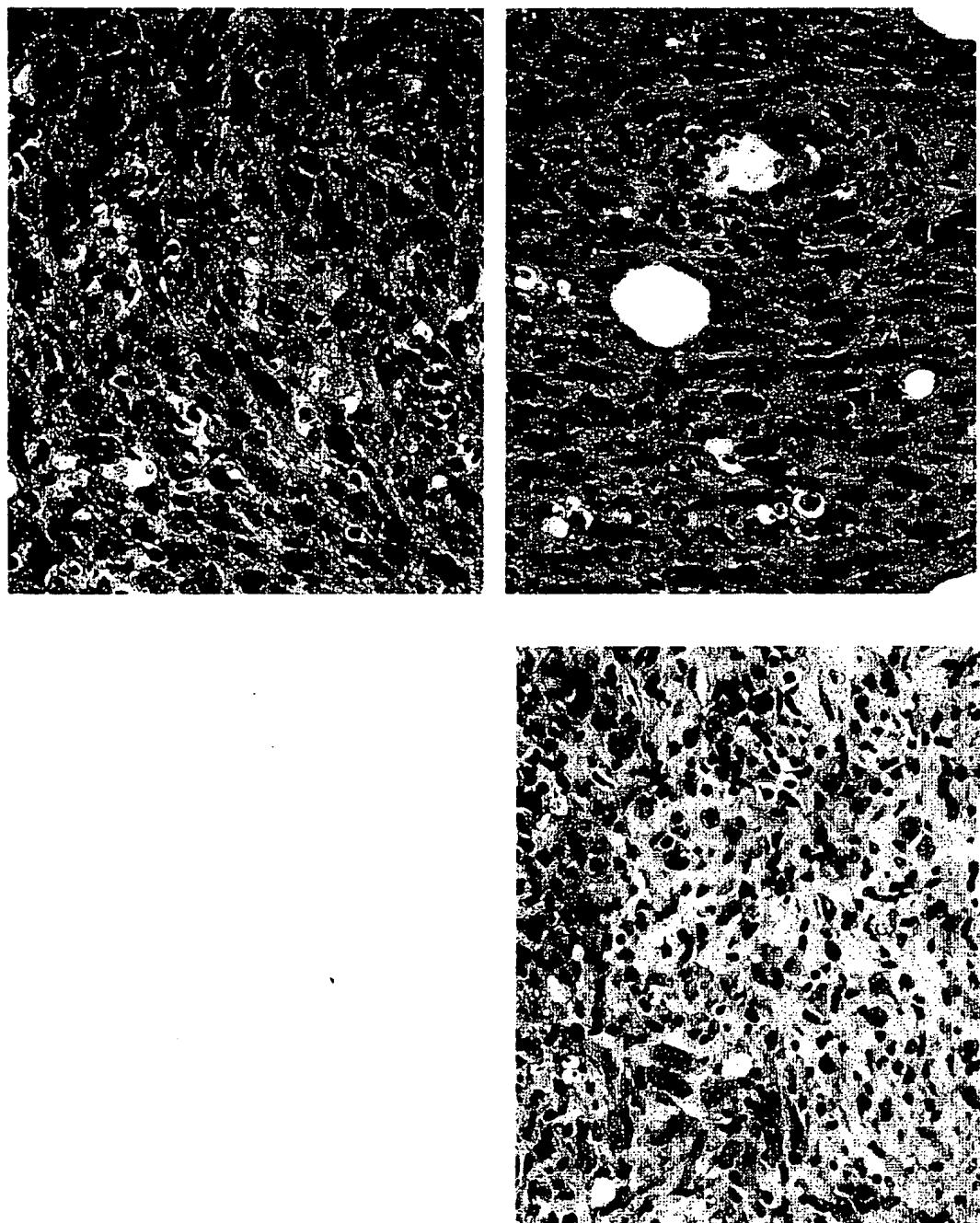
【図13】



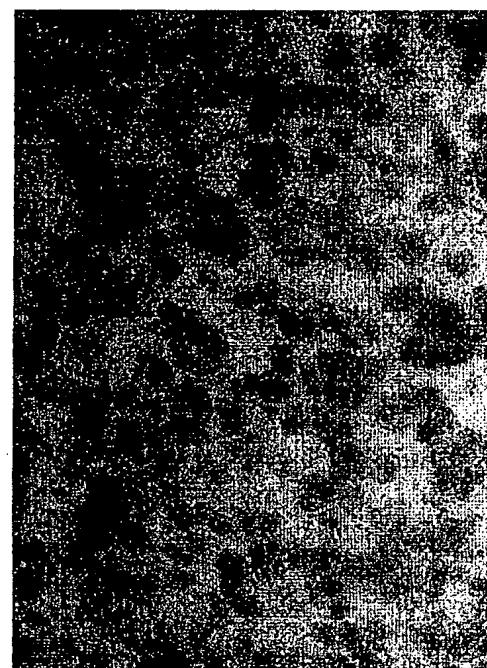
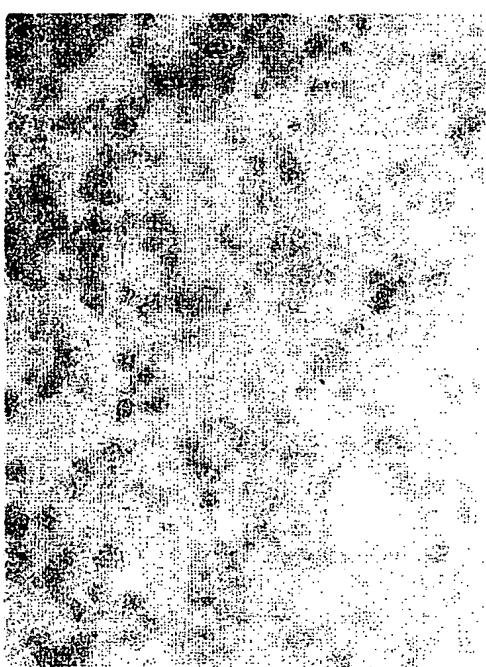
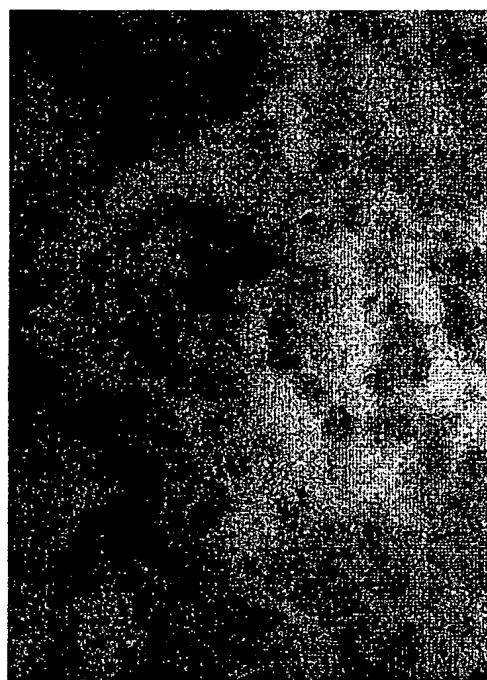
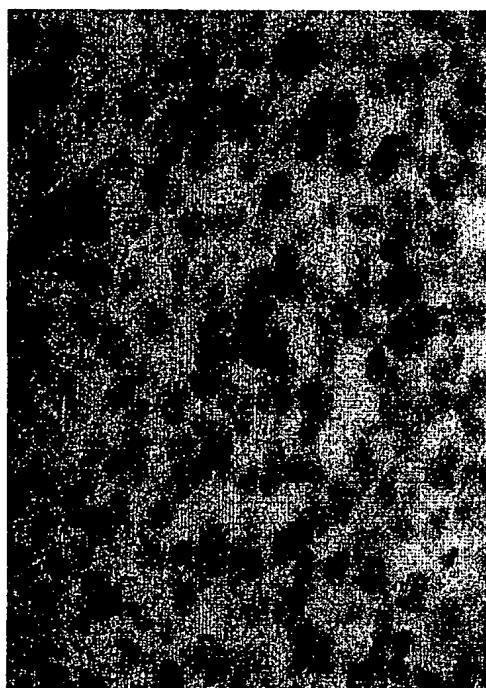
【図14】



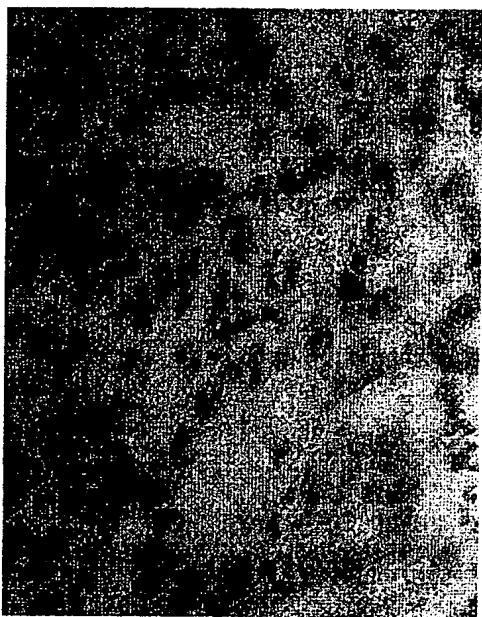
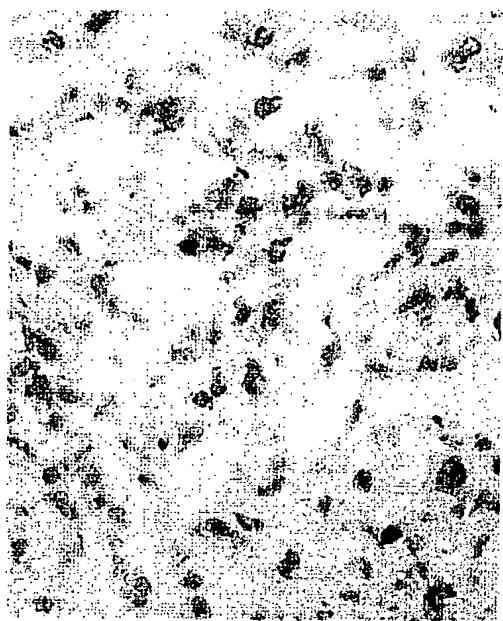
【図15】



【図16】

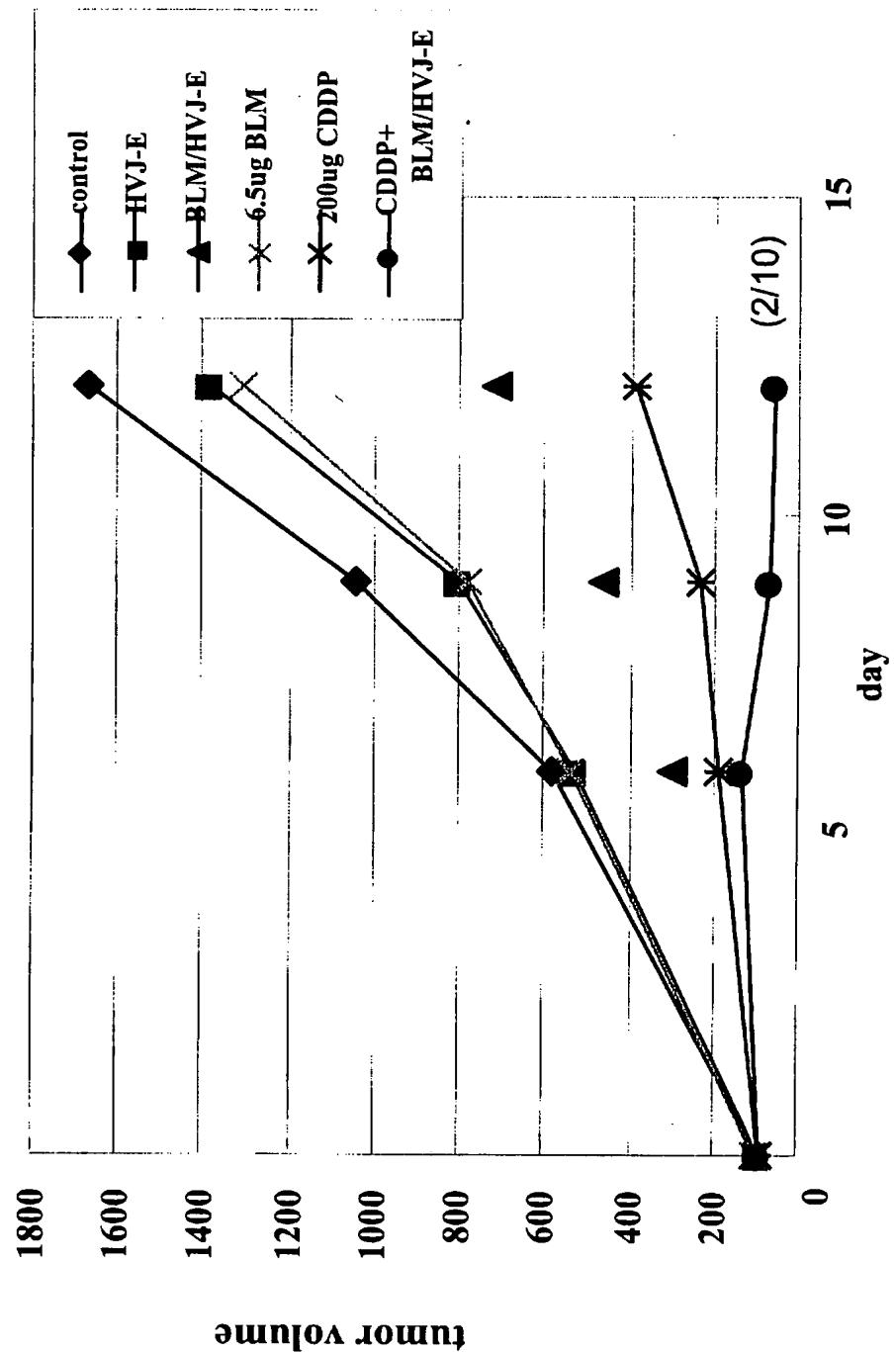


【図 1 7】

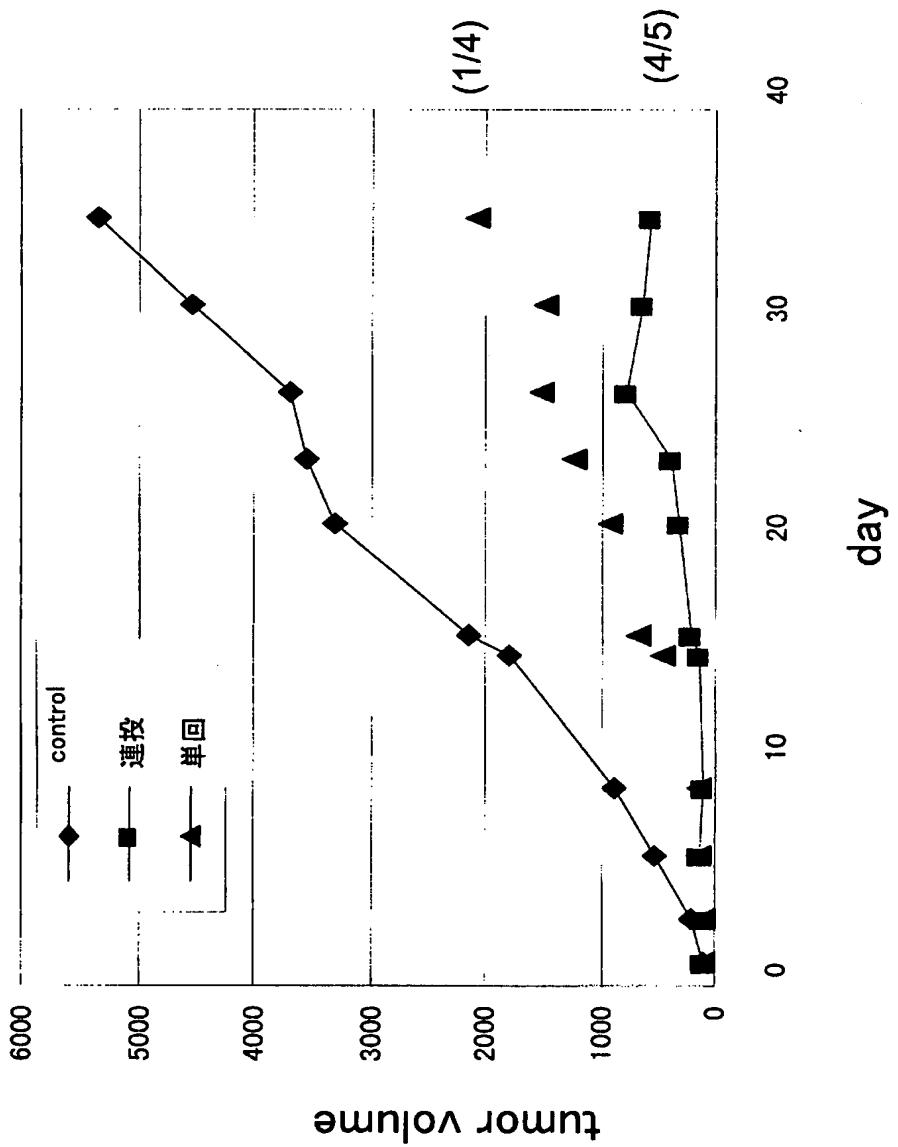


【図18】

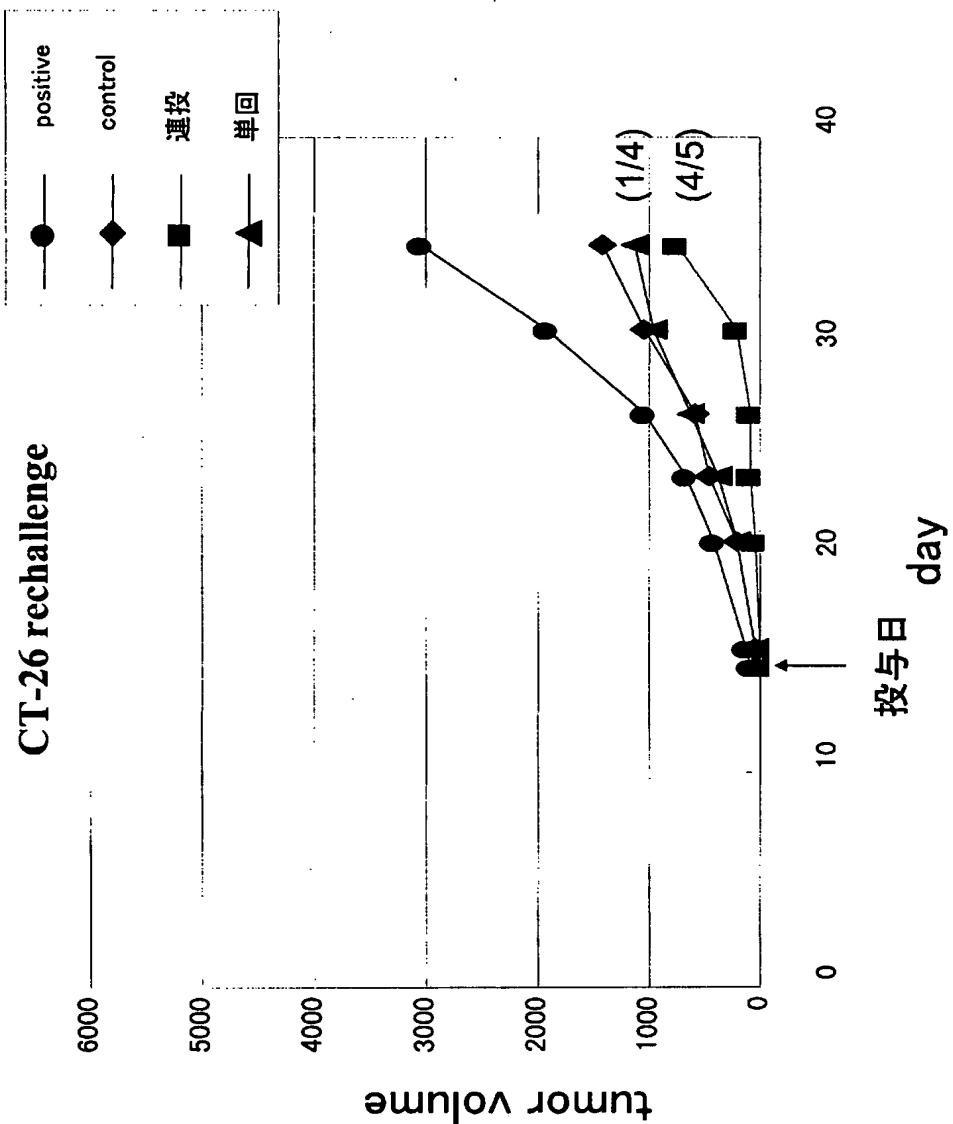
腫瘍径



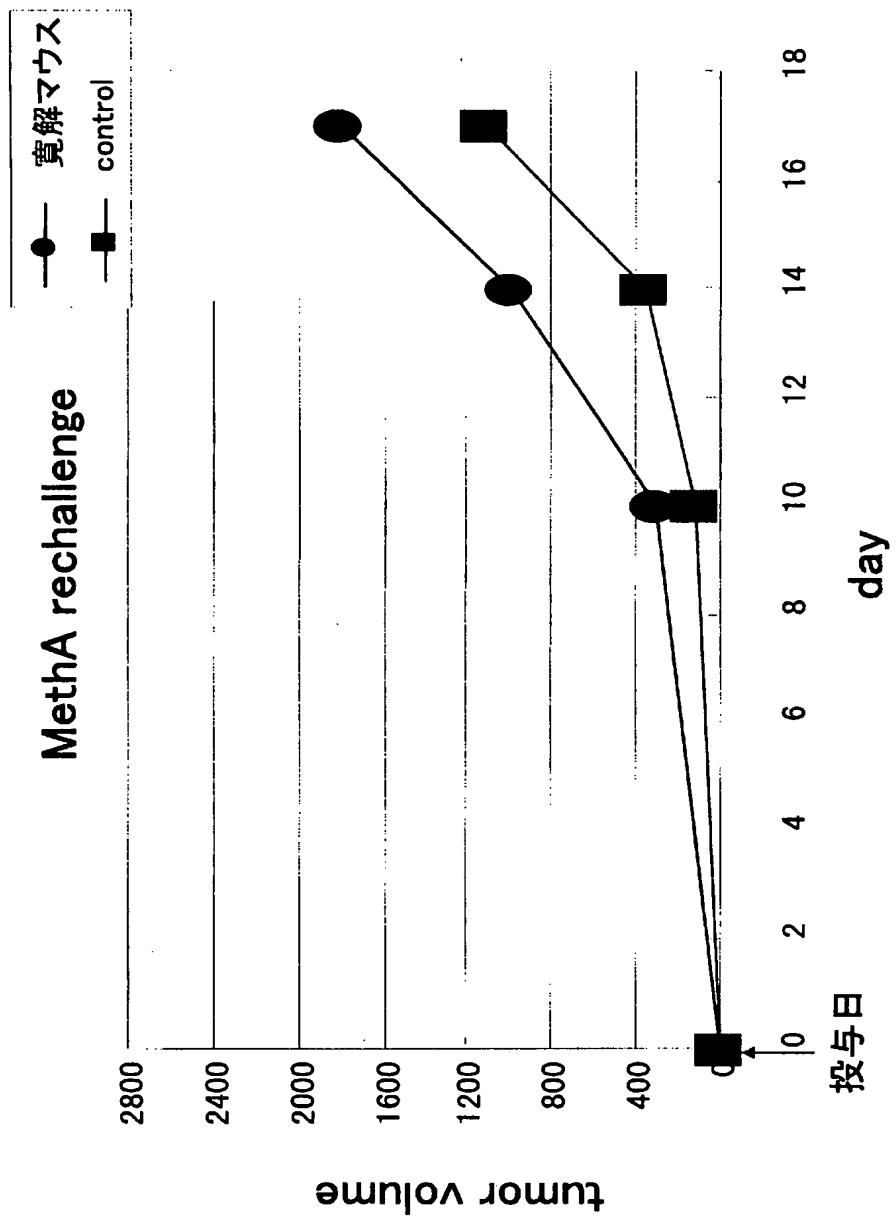
【図19】



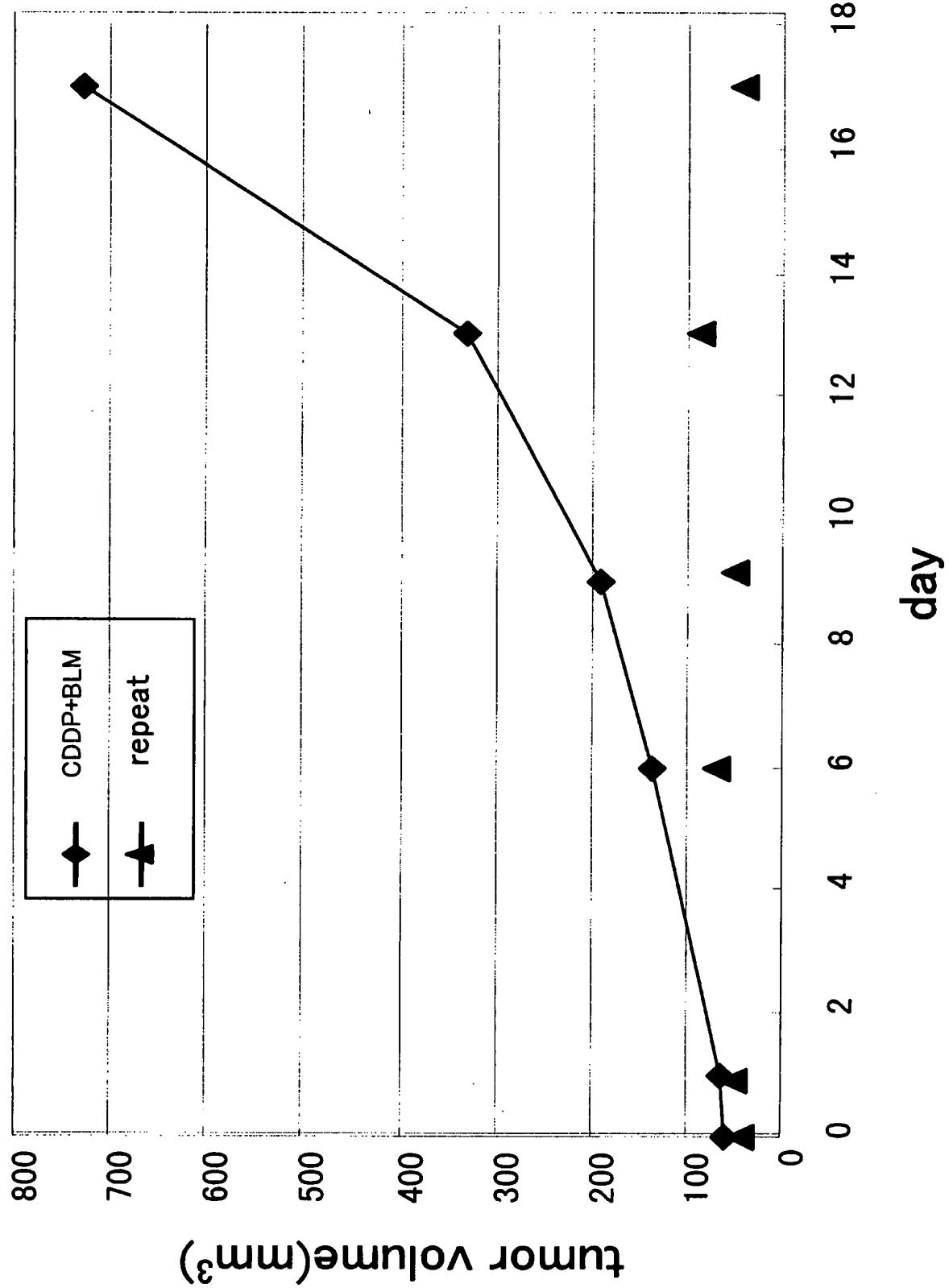
【図 20】



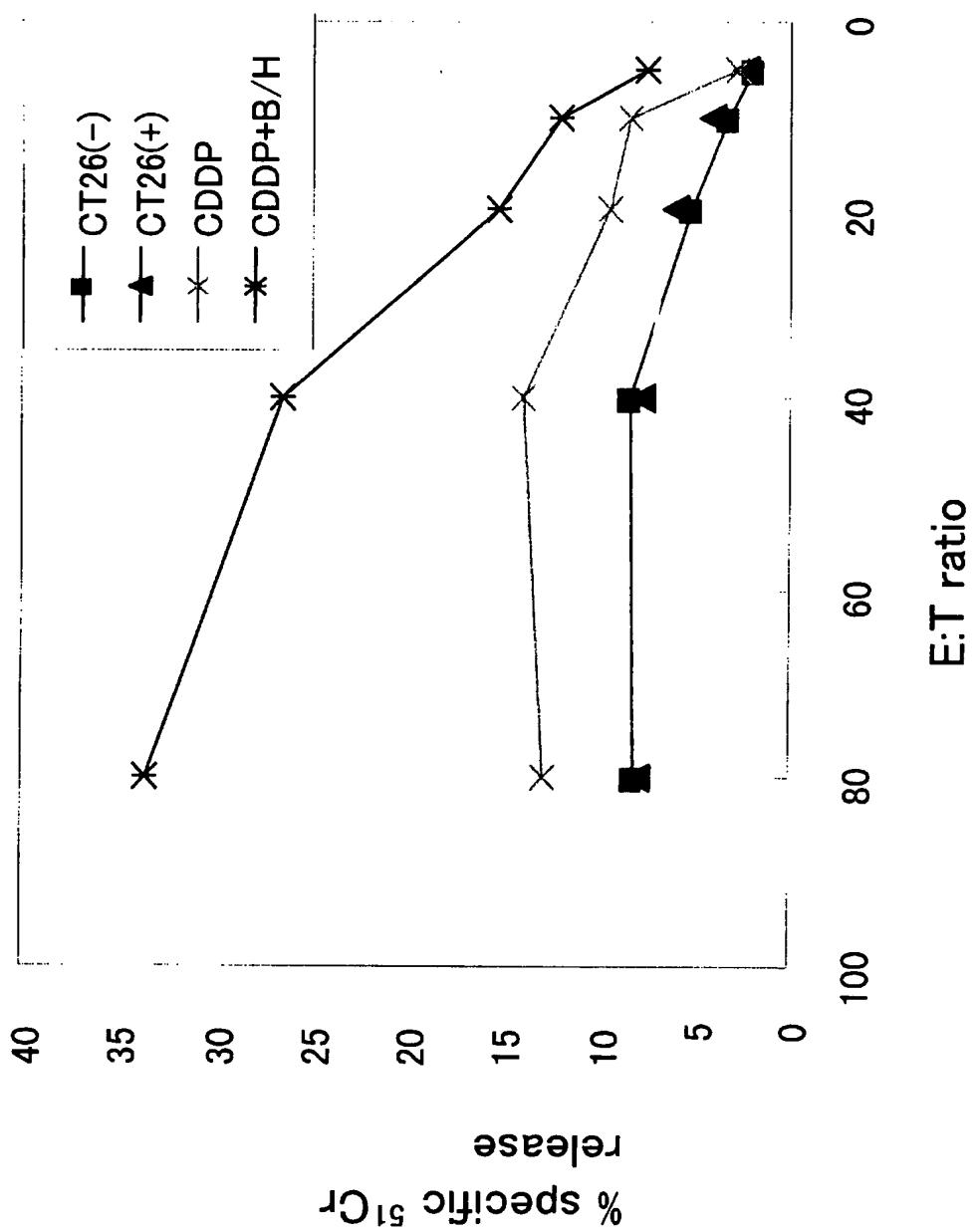
【図 2 1】



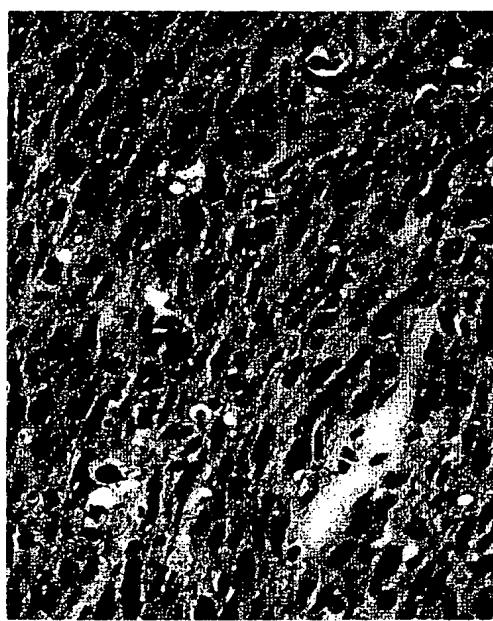
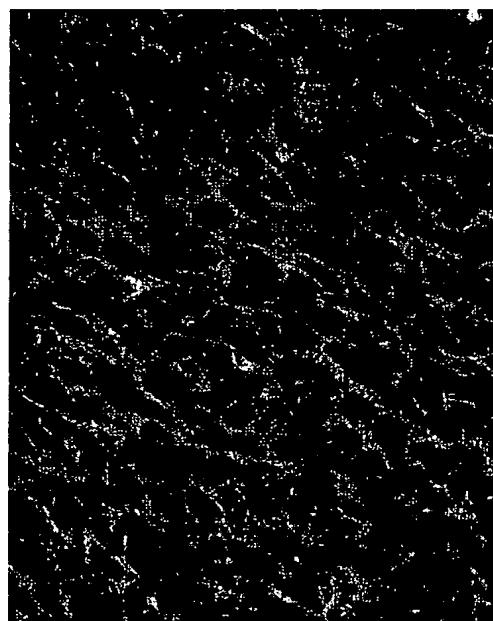
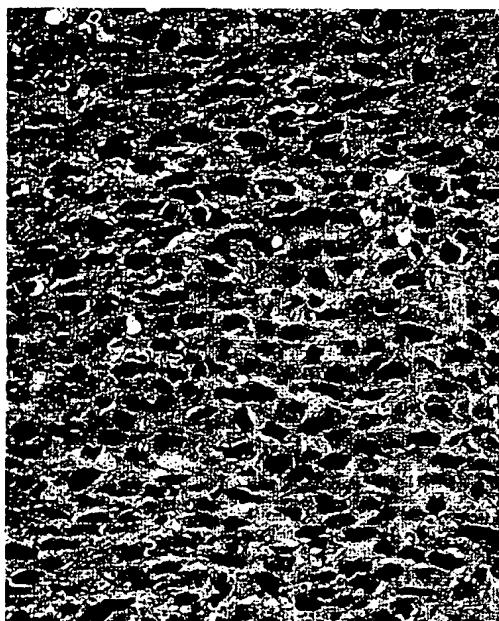
【図22】



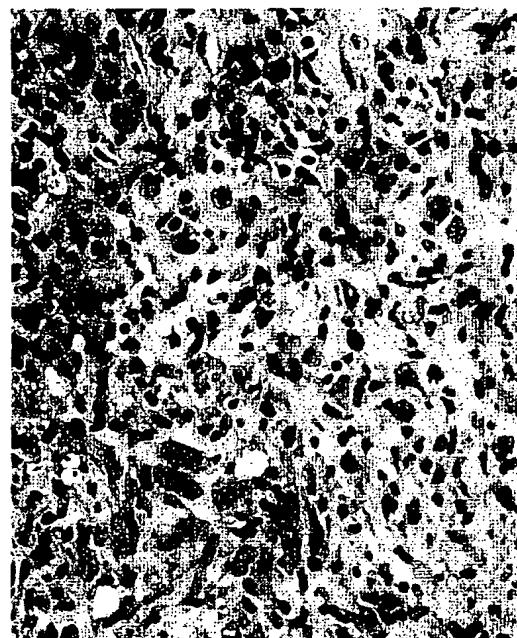
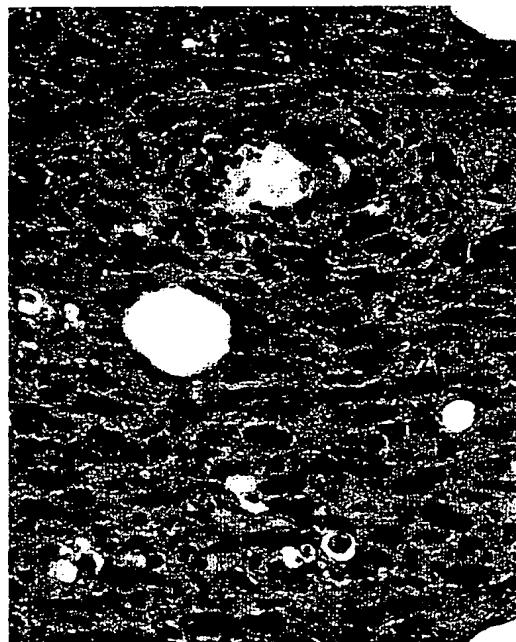
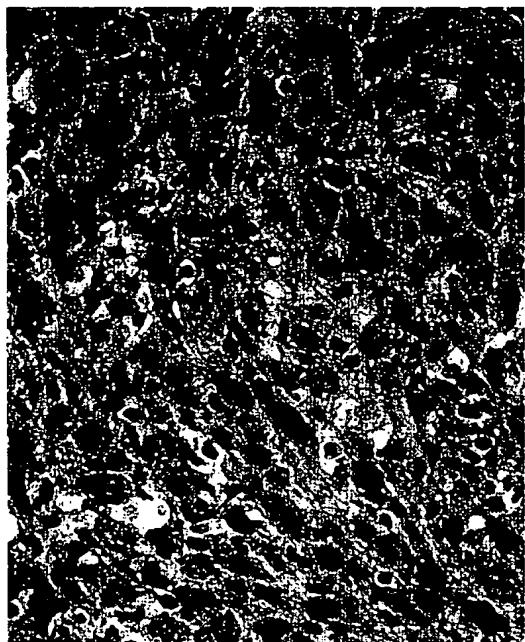
【図 2 3】



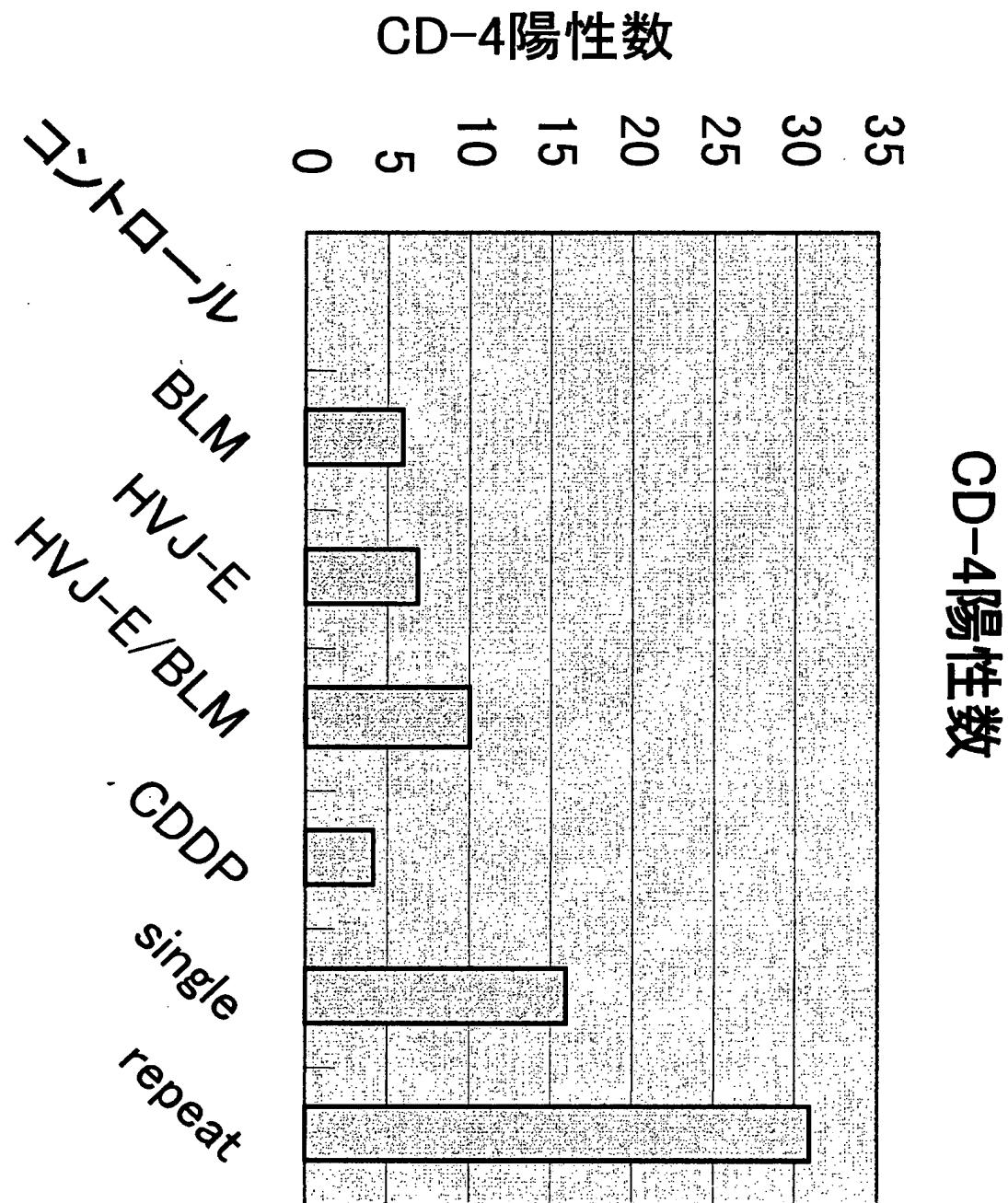
【図24】



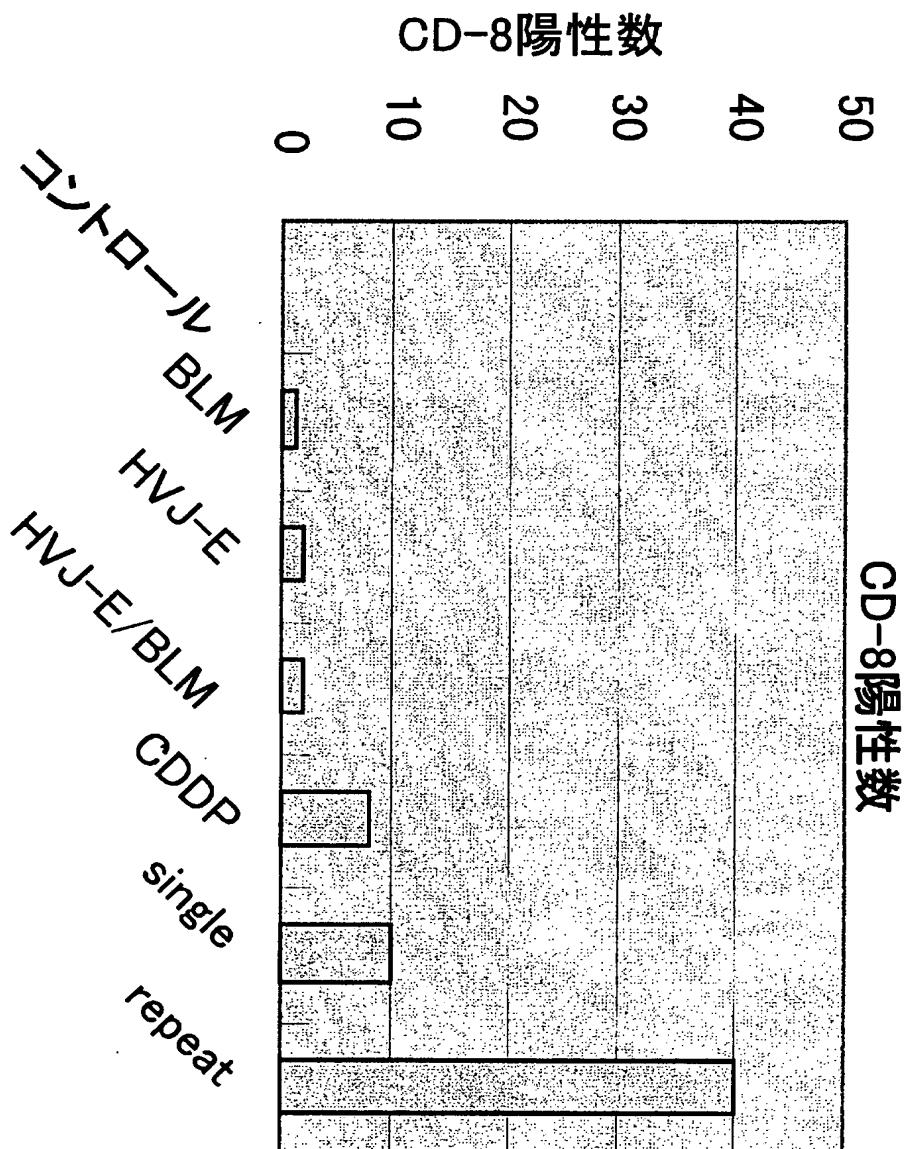
【図25】



【図26】



【図27】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 本発明は、ウイルスエンベロープベクターを用いて細胞内あるいは生体内へ、化学療法剤、好ましくは抗癌剤を移入するための医薬組成物を提供する。

【解決手段】 免疫惹起能を有するウイルスエンベロープベクターに封入した化学療法剤を有効成分として含有することを特徴とする医薬組成物。さらにシトシン-グアニン・ジヌクレオチド [cytosine-guanine (CpG) dinucleotide] を配列中に含むCpG化合物等のアジュバントを含有する医薬組成物は優れた抗腫瘍免疫を有する。より具体的には、化学療法剤として例えはブレオマイシン類、シスプラチニン類等を、ウイルスとして例えはセンダイウイルス等を挙げることができる。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【提出日】 平成16年 5月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【事件の表示】
【出願番号】 特願2004-136756
【補正をする者】
【識別番号】 500409323
【氏名又は名称】 アンジェス エムジー株式会社
【代表者】 山田 英
【発送番号】 046808
【手続補正】
【補正対象書類名】 特許願
【補正対象項目名】 特許出願人
【補正方法】 追加
【補正の内容】
【その他】 本件手続をしたことに相違ありません。

出願人履歴

302060281

20021018

新規登録

大阪府大阪市北区天満四丁目15番5号

ジェノミディア株式会社

302060281

20040916

住所変更

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号

ジェノミディア株式会社

500409323

20040422

名称変更

501447007

大阪府豊中市新千里東町1丁目四番二号

アンジェスMG株式会社

500409323

20040916

住所変更

501447007

大阪府茨木市彩都あさぎ七丁目7番15号

アンジェスM G 株式会社